

PAULA KEIKO SATO

**Estudo de células dendríticas derivadas de monócitos de
pacientes com paracoccidioidomicose: expressão de
moléculas de superfície e secreção de citocinas**

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

Programa: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Maria Aparecida Shikanai Yasuda

**São Paulo
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sato, Paula Keiko

Estudo de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidioomicose : expressão de moléculas de superfície e secreção de citocinas / Paula Keiko Sato. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Maria Aparecida Shikanai Yasuda.

Descritores: 1.Paracoccidioomicose 2.*Paracoccidioides brasiliensis*
3.Células dendríticas 4.Citocinas 5.Imunidade celular

USP/FM/DBD-304/10

Aos pacientes envolvidos no estudo

Aos meus pais Paulo e Wilma

À minha orientadora Profa. Maria Aparecida Shikanai Yasuda,

pelo apoio, paciência e incentivo por todo o caminho.

E à amiga, Dra. Telma Miyuki Oshiro,

pela amizade e pelas eternas “consultas de Imunologia”.

A todos que já passaram ou estão no **Laboratório de Investigação Médica em Imunologia (LIM 48)**, Alexei, Aya, Carolina Mamana, Célia, Claudia Fonseca, Claudia Ubida, Constância, Débora, Diego, Érika Passos, Érika Shimoda, Eron, Fernanda, Flávia, Karina, Marcelo Magri, Márcia Ferreira, Márcia Yoshida, Maria Izani, Marjorie, Natália, Nídia, Rafael, Sheila, Tatiane, Telma e Vera, pela amizade e apoio na realização desse trabalho.

À minha irmã e amiga, **Thaís**, por estar sempre disposta a me ouvir, me aconselhando e me acalmando nas horas difíceis.

Ao meu irmão, **Daniel**, minha cunhada, **Luciana**, e minha sobrinha, **Júlia**, pois a formação de sua família me trouxe muita alegria.

Às amigas, **Constância L. D. Lorente** e **Érika C. Passos**, pelo companheirismo e por todo auxílio nos experimentos.

À **Dra. Adriana Kono** e à **Dra. Márcia Yoshida**, por toda ajuda na seleção dos pacientes.

Às **funcionárias do Ambulatório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias**, sempre prontas para ajudar, sempre dedicadas aos pacientes.

À minha banca de qualificação, **Prof. José Alexandre M. Barbuto, Prof. Sandro R. de Almeida e Dra. Carla Pagliari**, por dedicarem tempo e atenção ao meu trabalho e pelas sugestões tão preciosas que me ajudaram a elaborar o trabalho final.

Às secretárias da pós-graduação do programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias, **Roseli Antônia Santo, Vânia Regina Miguel e Rosemeire A. Moraes Ribeiro**, por toda a ajuda durante o curso, nas horas de alegria e desespero.

Às amigas, **Agata, Beatlis, Juliana, Marina Matera, Marina Saito e Najara**, pela amizade e pelas horas de muito riso que me ajudaram a passar por todo o processo com um pouco de leveza.

Às **Daniela, Juliana, Mirela, Paula e Renata**, por toda a força no final do caminho e por me ajudarem a “creer” um pouco mais!

Ao **Dr. Luiz Jorge Fagundes**, por me dar a mão num momento difícil, antes mesmo de me conhecer, e me levar para a Micologia.

À **Natalina Takahashi de Melo**, por abrir as portas do reino dos fungos e me indicar o caminho até o laboratório.

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização desse trabalho, meu sincero obrigada!

Este estudo foi realizado com apoio financeiro da Fundação de apoio à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2004/14955-3), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 566478/2008-0) e da Fundação Faculdade de Medicina.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	14
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Casuística	17
3.2 Critérios de inclusão	17
3.3 Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos aderidos à placa de cultura	19
3.4 Diferenciação das células dendríticas derivadas de monócitos por seleção magnética positiva de células CD14 ⁺	20
3.5 Estímulo das células dendríticas	21
3.6 Estímulo de células dendríticas de indivíduos sadios com sobrenadantes da cultura de células dendríticas de pacientes com PCM tratada	22
3.7 Caracterização de células dendríticas	23
3.8 Detecção das citocinas IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-1 β e IFN- γ em sobrenadantes de cultura	24
3.9 Detecção da quimiocina CCL18 em sobrenadantes de cultura	26
3.10 Análises dos resultados	28
3.11 Esquema geral do experimento	29
3.11.1 Experimento principal	29
3.11.2 Experimento secundário	30

4. RESULTADOS	31
4.1 Padronização dos ensaios de diferenciação de células dendríticas	32
4.2 Comparação da expressão de moléculas de superfície de células dendríticas derivadas de monócitos entre grupos de indivíduos sadios e pacientes com PCM	36
4.2.1 Expressão da molécula CD11c	37
4.2.2 Expressão da molécula CD1a	39
4.2.3 Expressão da molécula HLA-DR	41
4.2.4 Expressão da molécula CD86	43
4.2.5 Expressão da molécula CD80	45
4.2.6 Expressão da molécula DC-SIGN	47
4.3 Secreção de citocinas por células dendríticas	49
4.3.1 Níveis da citocina IL-10	49
4.3.2 Níveis da citocina IL-12p40	51
4.3.3 Níveis da quimiocina CCL18	53
4.4 Efeito dos sobrenadantes de culturas de DCs de pacientes com PCM tratada sobre as DCs de indivíduos sadios	56
4.4.1 Efeito dos sobrenadantes de culturas de DCs de pacientes tratados sobre a expressão das moléculas de superfície de DCs de indivíduos sadios separadas por aderência ou por micropérolas	57
4.4.2 Efeito dos sobrenadantes de culturas de DCs de pacientes sobre a secreção de IL-10 e IL-12p40 por DCs de indivíduos sadios separadas por aderência ou por micropérolas	66
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÕES	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXO	111

LISTA DE ABREVIATURAS

a	aderência de monócitos
AP	pacientes com paracoccidiodomicose ativa
APCs	células apresentadoras de antígenos
b	micropérolas (<i>beads</i>)
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCL18	Quimiocina (C-C) Ligante 18
CD	Grupo de Diferenciação
CO	indivíduos saudáveis (controle)
CTLA-4	Antígeno 4 associado a linfócito T citotóxico
DCs	células dendríticas
DC+TNF	células dendríticas ativadas com TNF- α
DC-SIGN	Ligante não-integrina de ICAM DC-específica
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imuno-enzimático
et al.	e outros
Fig.	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócito e macrófagos
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina

IMF	Intensidade Média de Fluorescência
ND	níveis não-detectados
nDC	células dendríticas não-tratadas
PAC	Pacientes
PBS	tampão salina fosfato
PCM	paracoccidiodomicose
PE	ficoeritrina
SEM	Erro Padrão da Média
SN	sobrenadante
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TP	pacientes com paracoccidiodomicose tratada

LISTA DE SÍMBOLOS

\approx	aproximadamente
$>$	maior
$<$	menor
\geq	maior ou igual
\leq	menor ou igual
\pm	mais ou menos
kDa	quilo-Dalton
$\mu\text{g/mL}$	microgramas por mililitro
M	molar
ng/mL	nanogramas por mililitro
nM	nanomolar
nm	nanômetros
N	normal
pg/mL	picogramas por mililitro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfil em citometria de fluxo de células dendríticas derivadas de monócitos de sangue periférico de indivíduo sadio. Perfil característico de populações celulares presentes na cultura de células dendríticas derivadas de monócitos em análise por citometria de fluxo, segundo características de tamanho (abscissa) e granulosidade (ordenada). A população delineada pela área R1 (“*gate*”) representa células com características de monócitos, considerada como população de estudo. 34
- Figura 2.** Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos. Análise de percentual de células positivas (A) e IMF (B) para os marcadores CD11c, CD1a, CD86 e HLA-DR, analisadas em população definida na área R1 (“*gate*”). Células não-tratadas (nDC) originam-se de monócitos estimulados para diferenciação em células dendríticas, obtidas no 6^o dia de cultura e sem aplicação de outro tratamento e, quando tratadas com TNF- α por 48 horas, se tornam células ativadas (DC+TNF). Resultados de um indivíduo sadio (representativo de 3 experimentos isolados de 3 indivíduos sadios, com variação <10%). 35
- Figura 3.** Percentual de células CD11c positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos sadios (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com erro padrão da média. 38
- Figura 4.** Percentual de células CD1a positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos sadios (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM. 40

- Figura 5.** Percentual de células HLA-DR positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos saudáveis (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 42
- Figura 6.** Percentual de células CD86 positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos saudáveis (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 44
- Figura 7.** Percentual de células CD80 positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos saudáveis (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 46
- Figura 8.** Percentual de células DC-SIGN positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos saudáveis (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 48
- Figura 9.** Níveis da citocina IL-10 (em pg/mL) em sobrenadantes de cultura de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 14 indivíduos saudáveis (CO), 15 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 50

- Figura 10.** Níveis da citocina IL-12p40 (em pg/mL) em sobrenadantes de cultura de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos saudáveis (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 20 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 52
- Figura 11.** Níveis da quimiocina CCL18 (em ng/mL) em sobrenadantes de cultura de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 11 indivíduos saudáveis (CO), 13 pacientes com PCM ativa (AP) e 20 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 53
- Figura 12.** Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre o percentual de células CD11c positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos saudáveis (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 59
- Figura 13.** Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre o percentual de células CD1a positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos saudáveis (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 60
- Figura 14.** Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre o percentual de células HLA-DR positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos saudáveis (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 61

- Figura 15.** Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre o percentual de células CD86 positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos sadios (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 63
- Figura 16.** Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre o percentual de células CD80 positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos sadios (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 64
- Figura 17.** Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre o percentual de células DC-SIGN positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos sadios (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 65
- Figura 18.** Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre a secreção de IL-10 por células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos sadios (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 67
- Figura 19.** Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre a secreção de IL-12p40 por células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos sadios (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$. 69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição dos pacientes incluídos no estudo segundo gênero, idade, grupo e forma clínica da PCM. 18
- Tabela 2.** Sumário das análises estatísticas relativas às diferenças entre as culturas de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α (DC+TNF), de pacientes com PCM ativa (AP) e PCM tratada (TP), e de indivíduos saudáveis (CO). 54
- Tabela 3.** Sumário das análises estatísticas relativas às diferenças entre os grupos de indivíduos saudáveis (CO), pacientes com PCM ativa (AP) e PCM tratada (TP), segundo a cultura de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α (DC+TNF). 55
- Tabela 4.** Sumário das análises estatísticas relativas às diferenças entre as culturas de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α (DC+TNF), de pacientes com PCM tratada (PAC) e de indivíduos saudáveis (CO), separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b). 70

SATO PK. Estudo de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidiodomicose: expressão de moléculas de superfície e secreção de citocinas [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 110 p.

INTRODUÇÃO: A paracoccidiodomicose (PCM), causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, é uma doença sistêmica granulomatosa, endêmica em toda América Latina. Estudos anteriores no modelo experimental e em humanos relacionaram a resposta imune tipo Th1 à proteção, com imunodepressão antígeno-específica transitória nas formas aguda e crônica, e recuperação após cura clínica. As células dendríticas de origem mielóide (DCs) são as mais potentes apresentadoras de antígeno, sendo capazes de induzir resposta Th1 em linfócitos T, porém seu papel na PCM humana ainda não foi descrito. **OBJETIVO:** Investigar as características *in vitro* de DCs derivadas de monócitos de pacientes com PCM. **MÉTODOS:** DCs de pacientes com PCM ativa (AP) e tratada (TP), e de indivíduos saudáveis (CO) foram geradas a partir de monócitos do sangue periférico aderidos ao plástico e tratados com IL-4 e GM-CSF. Após 6 dias, as DC diferenciadas (CD11c⁺, CD1a⁺, CD14⁻) foram ativadas com TNF- α (DC+TNF) ou deixadas sem estímulo (nDC) por 48 horas. As moléculas de superfície CD11c, CD1a, HLA-DR, CD86, CD80 e DC-SIGN das DCs foram analisadas por citometria de fluxo e as citocinas IL-10, IL-12p40 e CCL18 foram dosadas nos sobrenadantes das culturas por ELISA. As DCs de TP e CO também foram geradas a partir de monócitos obtidos por seleção positiva em coluna magnética (micropérolas) e comparadas às células obtidas pelo método de aderência. Os sobrenadantes das DCs de TP foram utilizados como estímulo das DCs de CO e as moléculas de superfície e a secreção de citocinas foram analisadas novamente. **RESULTADOS:** As DCs dos grupos AP e TP apresentaram expressão de CD11c e CD1a similar à observada nas DCs de CO. No grupo TP, foi observada maior expressão de HLA-DR, CD86 e DC-SIGN nas nDC e HLA-DR e CD86 nas DC+TNF que nos grupos AP e CO que, por sua vez, apresentaram percentual de DCs positivas e a expressão dessas moléculas similares. As nDC do grupo AP secretaram significativamente menos IL-10 que as DCs de CO, sendo que a ativação com TNF- α reduziu a produção dessa citocina em todos os grupos. O efeito oposto foi observado na secreção de IL-12p40, sendo que as DC+TNF do grupo TP apresentaram os maiores níveis dessa citocina. Tanto nDC quanto DC+TNF do grupo AP secretaram mais CCL18 que as correspondentes do grupo TP. Os sobrenadantes de TP tiveram pouco ou nenhum efeito sobre as DCs de CO. **CONCLUSÕES:** DCs derivadas de monócitos do sangue periférico de pacientes com PCM podem ser diferenciadas e ativadas *in vitro* com TNF- α , expressando as moléculas de superfície características. DCs de pacientes com PCM tratada tem alta expressão de HLA-DR, CD86 e DC-SIGN e secreção aumentada de IL-12p40, e DCs de pacientes com a doença ativa apresentam expressão de moléculas similar às de DCs de indivíduos saudáveis. DCs obtidas por aderência de monócitos resultaram em maior frequência de DCs CD86⁺, com maior secreção de IL-12p40 que células obtidas por micropérolas em amostras de indivíduos saudáveis e de pacientes tratados. Neste trabalho demonstrou-se a plasticidade *in vitro* de DCs derivadas de monócitos de pacientes com PCM, revelando o potencial dessas células na geração de uma resposta imune protetora. **Descritores:** 1. Paracoccidiodomicose; 2. *Paracoccidioides brasiliensis*; 3. Células dendríticas; 4. Citocinas; 5. Imunidade celular

SATO PK. Study of monocyte-derived dendritic cells from patients with paracoccidioidomycosis: expression of surface molecules and cytokines secretion [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 110 p.

INTRODUCTION: Paracoccidioidomycosis (PCM) is caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, being a granulomatous systemic disease, endemic in Latin America. Previous studies on experimental and human PCM have established the relation between Th1 immune response and protection, antigen-specific transitory immunodepression in acute and chronic forms and recovery after clinical treatment. Myeloid dendritic cells (DCs) are the most potent antigen presenting cells, capable of inducing Th1 response on T lymphocytes. Their role on human PCM has not yet been described. **OBJECTIVE:** To investigate *in vitro* characteristics of monocyte-derived DCs from PCM patients. **METHODS:** DCs from active (AP) and treated PCM (TP) and from healthy individuals (CO) were generated from plastic adhered monocytes treated with IL-4 and GM-CSF. After 6 days, differentiated DCs (CD11c⁺, CD1a⁺, CD14⁻) were activated with TNF- α (DC+TNF) or untreated (nDC) for 48 hours. Surface molecules CD11c, CD1a, HLA-DR, CD86, CD80 and DC-SIGN were analyzed by flow cytometry and cytokines IL-10, IL-12p40 and CCL18 were assayed on cultures supernatants by ELISA. DCs from the TP and the CO groups were also generated from positive selection of monocytes on magnetic column (microbeads) and compared to adhered monocyte-derived DCs. DC from the CO group were stimulated with supernatants from the TP cultures followed by flow cytometric analysis of surface molecules and production of cytokines. **RESULTS:** DCs from the AP and the TP groups showed similar expression of CD11c and CD1a in comparison to the CO group. On the TP group, nDC showed higher expression of HLA-DR, CD86 and DC-SIGN and DC+TNF of HLA-DR and CD86 than the AP and the CO groups which had similar percentage of positive cells and expression of these molecules. nDC from the AP group showed significantly lower levels of IL-10 than the CO group and decreased levels of this cytokine were observed with TNF- α activation. The opposite effect was observed on IL-12p40 production in which DC+TNF from the TP group showed the highest levels. Both nDC and DC+TNF from the AP group had increased levels of CCL18 compared to the TP cells. Supernatants from TP had little or no effect on DCs from the CO group. **CONCLUSIONS:** Peripheral blood monocyte-derived DCs from patients with PCM can be differentiated and activated with TNF- α *in vitro* with expression of typical molecules. DCs from patients with treated PCM showed up-regulation of HLA-DR, CD86 and DC-SIGN and the highest production of IL-12p40. DCs from patients with active PCM had similar expression of these molecules compared to control group. Adherence of monocytes resulted in higher frequency of CD86⁺ DCs with up-regulation of IL-12p40 than microbeads positive selection method on samples from healthy donors and treated patients. This study demonstrated the *in vitro* plasticity of monocyte-derived DCs from patients with PCM, revealing the potential of these cells in generating a protective immune response.

Keywords: 1. Paracoccidioidomycosis; 2. *Paracoccidioides brasiliensis*; 3. Dendritic cells; 4. Cytokines; 5. Cellular immunity

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença sistêmica granulomatosa, de evolução aguda ou crônica, causada por um fungo dimórfico, *Paracoccidioides brasiliensis*. É uma das mais importantes micoses endêmicas na América Latina, prevalente do México à Argentina, sendo considerada uma doença adquirida em áreas rurais por indivíduos previamente imunocompetentes, mas emergente como uma doença grave em centros urbanos em pacientes sob imunossupressão relacionada à infecção por HIV ou à quimioterapia por neoplasia ou transplante de órgão (Marques & Shikanai-Yasuda, 1994). No estado de Rondônia, mais de 800 casos foram registrados em 5 anos (Lima & Durlacher, 2003), sendo a primeira causa de morte no Brasil entre as micoses sistêmicas (Prado et al., 2009).

O contágio ocorre por inalação de conídios, partículas infectantes de 3 a 5 µm de diâmetro (Bustamante-Simon et al., 1985), que no tecido pulmonar se transformam em leveduras e induzem uma resposta inflamatória inicialmente mediada por células polimorfonucleares, seguida por infiltrado linfomononuclear que pode se apresentar como um complexo primário no modelo experimental (McEwen et al., 1987). Na maioria das vezes, este contato do fungo com a criança ou adulto jovem resulta em equilíbrio da interação parasito-hospedeiro, constituindo a paracoccidioidomicose infecção, permanecendo o fungo latente nos tecidos. Se nesta interação não ocorrer o equilíbrio observado na infecção, a doença pode ocorrer na forma aguda, com disseminação linfohematogênica acometendo o sistema fagocítico mononuclear. A doença também ocorre na forma crônica, após muitos anos, na idade

adulta, principalmente após a terceira década, quando se rompe o equilíbrio da interação hospedeiro-parasito. Há reativação de lesões quiescentes, sendo mais frequentemente acometido o pulmão, podendo estar comprometidos outros órgãos e tecidos.

A evolução da infecção para doença depende de vários fatores como a interação entre o ambiente, resposta imune do hospedeiro e patogenicidade do parasito. Embora várias expressões dessa evolução tenham já sido descritas (Oliveira et al., 2002; Calvi et al., 2003; Cavassani et al., 2006; Ferreira et al., 2007), os mecanismos que controlam a evolução da interação hospedeiro-parasito são pouco conhecidos (Barroso et al., 2010; Vicentini et al., 1994; Sadahiro et al., 2007a; Martinez e Moya, 1992).

A relação entre imunidade por células e formas clínicas da doença foi descrita por Musatti et al. (1976) e Mota et al. (1985), demonstrando-se maior grau de imunodepressão celular nas formas disseminadas e menor grau nas localizadas. Posteriormente, Benard et al. (1996) observaram imunodepressão transitória ao antígeno de *P. brasiliensis* com recuperação nas formas clínicas agudas e crônicas após a cura clínica.

O antígeno majoritário de *P. brasiliensis* é secretado pela fase infectante do fungo, sendo caracterizado como uma glicoproteína de 43 kDa (gp43), rica em manose, e que se liga à Concanavalina A (Travassos, 1994). Além disso, é também capaz de se ligar à laminina da matriz extracelular, facilitando a ação patogênica do fungo *in vivo* (Lopes et al., 1994; Vicentini et al., 1994). O seqüenciamento e clonagem do gene que codifica a gp43 revelaram que o quadro de leitura deste gene está localizado num fragmento de 1.329 pares de bases, contendo dois éxons

interrompidos por um íntron de 78 nucleotídeos (Cisalpino et al., 1996). Também foi verificado que a gp43 é capaz de promover reações de hipersensibilidade tardia, tanto em animais quanto em humanos (Godoy et al., 2003; Saraiva et al., 1996; Kalmar et al., 2004).

Tendo como alvo identificar epítomos da gp43 indutores de uma resposta de hipersensibilidade tardia, considerada protetora, Taborda et al. (1998) demonstraram que entre as frações de peptídeos derivados da gp43, um peptídeo de 15 aminoácidos (P10) foi capaz de promover a ativação de células T murinas e induzir altos níveis de IFN- γ em ensaios *in vitro*. Além disso, P10 promoveu uma resposta protetora em camundongos desafiados intratraquealmente com cepas virulentas de *P. brasiliensis*, abrindo perspectivas para aplicação deste peptídeo na terapêutica.

A gp43 é detectada sistemicamente nas formas ativas da doença, sendo útil para fins diagnósticos e de controle pós-terapêutico, como observado pela pesquisa deste antígeno em sangue (Mendes-Giannini et al., 1990; Marques da Silva et al., 2004), na urina (Salina et al., 1998) e no líquor (Marques da Silva et al., 2004). No entanto, a aplicabilidade da gp43 no diagnóstico e principalmente no controle pós-terapêutico tem sido inviável na prática clínica, devido à limitação na obtenção do antígeno em larga escala, em função de dificuldades técnicas.

Esta glicoproteína revelou ser um antígeno majoritário, capaz de induzir a produção de anticorpos, além de ser reconhecido pela maioria dos pacientes infectados (Puccia & Travassos, 1991). O estudo de subclasses de IgG mostrou que em 41% dos pacientes com a forma crônica da doença observa-se presença de IgG2, enquanto IgG4 está presente em 100% dos pacientes de forma aguda (Baida et al., 1999). Por sua vez, Juvenale et al. (2001) utilizando antígeno bruto de *P.*

brasiliensis, descreveram IgG2 detectável em ambas as formas clínicas, com níveis mais elevados na forma crônica e IgG4 principalmente na forma aguda da doença. Ambos os autores relataram que a IgA foi mais freqüente nos pacientes com a forma crônica, do que na forma aguda da doença.

Com relação à susceptibilidade e resistência na PCM, Calich & Kashino (1998) mostraram que em modelo de camundongos isogênicos A/Sn (resistentes) e B10.A (suscetíveis), a produção de IFN- γ e IL-2 está relacionada ao papel protetor, sustentando fortemente a hipótese de resposta preferencial tipo 1 (Th1), associada ao fenótipo de resistência. Por outro lado, a suscetibilidade está ligada à resposta do tipo 2 (Th2) com produção de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β .

Em relação à PCM humana, o papel das citocinas na regulação da resposta imune vem sendo descrito desde 1995, no entanto, apenas mais recentemente o padrão de resposta imune segundo as diferentes formas clínicas vem sendo delineado.

Dessa forma, Karhawi et al. (2000) relataram que em pacientes com a forma crônica ativa da doença, a produção de IFN- γ foi baixa na presença de antígeno bruto de *P. brasiliensis* em relação aos pacientes com remissão clínica. Entretanto, a indução de IL-10 e TNF- α foi similar entre os grupos estudados.

Posteriormente, Benard et al. (2001) demonstraram que as células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas agudas e crônicas da PCM estimuladas com a gp43 produziam níveis baixos de IL-2 e IFN- γ e quantidades substanciais de IL-10, ao passo que indivíduos sadios sensibilizados com *P. brasiliensis* produziam níveis detectáveis das três citocinas, sendo mais elevados os níveis de IFN- γ e IL-2 em comparação aos pacientes. Além disso, a secreção de

IL-2 e IFN- γ foi inversamente correlacionada à quantidade de anticorpos específicos produzidos pelos pacientes e indivíduos sadios sensibilizados. O padrão de citocinas produzidos pelos pacientes com PCM parece ter importância na falta de resposta celular à gp43, com produção de elevados níveis de anticorpos não protetores.

No estudo descrito por Mamoni et al. (2002) observou-se que tanto pacientes com a forma aguda (juvenil) quanto com a forma crônica multifocal apresentaram níveis elevados de IgG4 e IgE anti-gp43 em comparação a pacientes com a forma crônica unifocal. Além disso, pacientes com a forma aguda apresentaram eosinofilia e um aumento nos níveis de TGF- β , citocina relacionada à inibição da resposta proliferativa de células T e à diminuição da ativação de macrófagos. A avaliação dos níveis de TNF- α , juntamente com a IL-6 e MIP-1 α não distinguiu a forma aguda da forma crônica. Paralelamente, níveis elevados destas citocinas foram detectados nos pacientes com forma crônica multifocal, quando comparada à forma unifocal. Em conjunto estes resultados sugerem uma resposta tipicamente Th2 tanto para a forma aguda (juvenil) quanto para a forma multifocal de PCM.

Oliveira et al. (2002) estudaram a resposta proliferativa e produção de citocinas de linfócitos de pacientes com forma aguda e forma crônica da PCM, em comparação aos indivíduos infectados e controles não infectados. Este estudo sugere, como nos anteriores, que a forma aguda seja um polo Th2 caracterizado pela produção de IL-4, IL-5 e IL-10. Estes mediadores, associados a baixos níveis de proliferação de linfócitos e de IFN- γ , resultariam na depressão da resposta imune celular com conseqüente manifestação grave da doença. Por outro lado, os indivíduos apenas infectados, sem a doença, representariam o polo oposto, com proliferação de linfócitos, alta produção de IFN- γ e, paralelamente, baixos níveis de IL-10. Este

perfil Th1 poderia levar a uma resposta imune eficiente capaz de prevenir o desenvolvimento da doença. Neste contexto, a forma crônica representaria um padrão intermediário da resposta imune na PCM, situado entre a resposta Th1 da infecção e Th2 de pacientes da forma aguda.

Complementando os estudos sobre secreção de citocinas na PCM, pôde-se documentar a elevada produção de IL-10 e TGF- β em mucosa e gânglios, particularmente neste último órgão, sugerindo a importância destas citocinas na disseminação da doença (Neworal *et al.*, 2003).

Trabalhos têm demonstrado que além das citocinas, quimiocinas também exercem importante papel na resposta imune à PCM, tendo sido demonstrado em modelo murino que a infecção por *P. brasiliensis* estimula a produção das quimiocinas inflamatórias KC, MCP-1, MIP-1 α , RANTES, Mig e IP-10, bem como induz a expressão dos receptores para quimiocinas CCR5 e CXCR3 no pulmão de camundongos infectados. Além disso, estes mesmos autores observaram que IFN- γ modula a expressão destas quimiocinas e conseqüentemente a composição do infiltrado leucocitário (Souto *et al.*, 2003).

Apesar dos grandes avanços na caracterização imunológica das diferentes formas clínicas, não se conhecem os fatores determinantes da evolução da infecção para doença e os fatores reguladores da gravidade da doença.

Neste contexto, entre os aspectos envolvidos, tem relevância a diferenciação de células T CD4⁺ para as sub-populações Th1 e Th2. Possíveis fatores relacionados à regulação de tal diferenciação seriam o microambiente de citocinas, as moléculas co-estimulatórias, a interação do receptor de linfócitos T (TCR) com o complexo peptídeo-MHC, a dose do antígeno e as células apresentadoras de antígeno (APCs)

(Hsieh et al., 1992). Estudos de populações de células T clonadas já diferenciadas sugerem que células apresentadoras de antígeno poderiam ter um importante papel em determinar o fenótipo de células T respondedoras (Pfeiffer et al., 1991). Trabalhos utilizando populações de células T clonadas descreveram que linfócitos Th1 eram estimulados preferencialmente quando macrófagos foram utilizados como APCs. Por outro lado, clones do tipo Th2 eram estimulados preferencialmente quando linfócitos B foram utilizados como APCs (Gajewski et al., 1991).

Além de macrófagos e linfócitos B, células dendríticas constituem-se em potentes células apresentadoras de antígenos capazes de realizar o processamento do antígeno e a apresentação de peptídeos a linfócitos T (Unanue & Allen, 1987).

Presente na maioria dos tecidos, as células dendríticas imaturas capturam e processam antígenos, migrando para os órgãos linfóides periféricos, onde amadurecem e expressam grandes quantidades de complexos MHC-peptídeos e moléculas co-estimulatórias, estabelecendo interação com células T antígeno-específicas. Todas essas atividades das células dendríticas podem ser induzidas por agentes infecciosos e por esta razão são consideradas sentinelas móveis que levam os antígenos às células T para indução da imunidade, conforme descrito por Banchereau & Steinman (1998).

Muitos fatores influenciam a capacidade das células dendríticas em polarizar a resposta de célula T para um padrão Th1 ou Th2. Dentre estes se destaca o subtipo de célula dendrítica, a natureza do estímulo para sua maturação e o microambiente no qual a célula é estimulada (Shortman & Liu, 2002).

Neste sentido, trabalhos *in vitro* têm demonstrado que diferentes subtipos de células dendríticas parecem estimular um padrão distinto de resposta de célula T.

Assim, Rissoan et al. (1999) descreveram que culturas de células T na presença do subtipo DC1, cujo precursor é o monócito (origem mielóide), produziram grandes quantidades de IFN- γ e baixos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10. Por outro lado, células T cultivadas em presença do subtipo DC2, cujo precursor são células plasmocitóides e acredita-se que tenham origem linfóide, secretam pouco IFN- γ e altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10. Estes resultados sugerem que *in vitro* DC1 é capaz de induzir a diferenciação de células Th1, enquanto DC2 favorece o desenvolvimento de células Th2.

Durante a apresentação antigênica, a interação entre a célula dendrítica e o linfócito T virgem, mediada por moléculas de adesão e co-estimulatórias, é fundamental para o início da resposta imune primária. Além das interações ICAM-1/LFA-1 e LFA-3/CD2, foi demonstrado recentemente que um receptor de ICAM-3, denominado DC-SIGN (*DC-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin*), expresso por células dendríticas, desempenha um importante papel no estabelecimento do primeiro contato entre células dendríticas e linfócitos T, uma vez que anticorpos anti-DC-SIGN inibiram a proliferação de linfócitos T induzida por células dendríticas (Geijtenbeek et al., 2000a).

Também têm papel crucial nesta fase de apresentação do antígeno ao linfócito T as quimiocinas, que por serem proteínas quimiotáticas, regulam o tráfego de células nos órgãos linfóides secundários (Baggiolini, 1998; Luster, 1998). Na malária experimental, a quimiocina DC-CK1 (CCL-18) produzida por células dendríticas foi capaz de aumentar a resposta de células TCD8⁺ antígeno-específicas, quando administrada juntamente com vacina de malária, sugerindo o potencial desta quimiocina como adjuvante (Bruna-Romero et al., 2003).

A importância das células apresentadoras de antígenos em modelos experimentais e, mais recentemente, com células dendríticas humanas diferenciadas *in vitro* a partir de células mononucleares do sangue periférico tem sido reconhecida tanto na iniciação como na evolução da resposta imune em doenças infecciosas.

Há mais de vinte anos, Gimenez et al. (1987) já haviam observado o baixo número de células de Langerhans dos pacientes com PCM crônica, sugerindo uma deficiência na apresentação de antígenos com possível papel na hiporeatividade dos linfócitos T na infecção por *P. brasiliensis*.

O papel das células apresentadoras de antígeno na PCM experimental foi investigado por Almeida et al. (1998), em modelo murino de suscetíveis e resistentes, nos quais a gp43 é apresentada por diferentes células conforme o padrão de suscetibilidade. Nos animais resistentes, houve apresentação preferencial por macrófagos e células dendríticas estimulando a produção de citocinas para a resposta via Th1. Por outro lado, em animais suscetíveis, a gp43 foi preferencialmente apresentada por células B ativando células do tipo Th2.

Ainda nesta mesma linha de estudo Almeida & Lopes (2001), observaram que as células dendríticas de camundongos suscetíveis (B10.A) foram menos eficientes que as células dos camundongos resistentes (A/Sn) nos ensaios de proliferação celular. Observaram ainda que, nos animais resistentes, as células dendríticas foram mais eficientes que macrófagos na estimulação e proliferação de linfócitos. Entretanto nenhuma diferença significativa foi observada na produção de IFN- γ ou IL-2. A baixa eficiência de células dendríticas de camundongos B10.A na estimulação de células T que secretam citocinas Th1 *in vitro* sugerem que este efeito possa estar envolvido na progressão da doença *in vivo*.

Recentemente este mesmo grupo demonstrou que células dendríticas murinas, ativadas por LPS e cultivadas na presença de gp43 ou de levedura de *P. brasiliensis*, apresentaram uma significativa redução tanto na expressão de moléculas co-estimulatórias quanto na produção de TNF- α e de IL-12, o que poderia estar relacionada à baixa resposta celular nos animais (Ferreira et al., 2004).

Uma característica das células dendríticas observada por D'Ostiani et al. (2000), foi a sua marcante plasticidade funcional em resposta às diferentes formas de fungos. Em ensaios *in vitro*, as células dendríticas foram capazes de discriminar as leveduras das hifas de *Candida albicans*, que foram internalizadas através de diferentes receptores, e geraram respostas imunes distintas. A endocitose das leveduras ativou células dendríticas com produção de IL-12 e sensibilizou células Th1, enquanto as hifas inibiram estas duas funções induzindo a produção de IL-4.

Nesta mesma linha de investigação, a atividade funcional de células dendríticas do pulmão em resposta aos conídios e hifas de *Aspergillus fumigatus* foi avaliada em camundongos BALB/c por Bozza et al. (2002). No estudo da internalização, receptores e mecanismos fagocíticos distintos foram identificados para as diferentes formas do fungo. Quando os receptores tipo lectina (MR e DEC-205) e opsoninas-dependentes (CR3, Fc γ RII e III) foram bloqueados, observou-se uma inibição da internalização de conídios e hifas, respectivamente. Além disso, semelhante aos resultados encontrados com *C. albicans*, a fagocitose dos conídios induziu a produção de IL-12 e a de hifas, a produção de IL-4 e IL-10.

O direcionamento para a resposta Th1 após a fagocitose de conídios de *A. fumigatus* foi observado também por Gafa et al. (2006), que notaram maturação completa e maior expressão de CCR7 pelas células dendríticas. Posteriormente, o

mesmo grupo demonstrou que essas células secretavam quimiocinas responsáveis pela mobilização de polimorfonucleares e células efectoras de memória (Gafa et al., 2007).

O papel das células dendríticas como iniciadoras e moduladoras da resposta imune na coccidiodomicose foi recentemente estudado por Richards et al. (2002). Geradas a partir de monócitos de pacientes com coccidiodomicose disseminada e não respondedores ao antígeno de *Coccidioides immitis*, as células dendríticas desses indivíduos foram pulsadas com antígeno coccidioidico e induziram proliferação de linfócitos. Tais células maduras foram mais eficientes nas estimulações em relação às células imaturas. Estes resultados mostram que as células maduras têm capacidade de estimular resposta imune específica de pacientes não respondedores ao antígeno coccidioidico *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos com manoproteínas de *Cryptococcus neoformans* (Pietrella et al., 2005) e *C. albicans* (Pietrella et al., 2006). Além disso, essas células podem ser usadas para selecionar antígenos como candidatos para o desenvolvimento de vacinas e para uso no tratamento das infecções fúngicas como terapia alternativa.

A imunodepressão antígeno-específica observada nos ensaios de linfoproliferação, bem como o predomínio de citocinas do tipo Th2 nas formas graves da doença estimula o estudo do papel das células dendríticas na possível modulação da resposta imune e na progressão da doença. Neste contexto, uma vez que as DCs desempenham papel ímpar na iniciação da resposta imune específica, o estudo de possíveis mecanismos envolvidos no direcionamento da resposta a antígenos de *P brasiliensis* torna-se de grande interesse.

Considerando a importância das células dendríticas na imunidade adquirida, documentada em camundongos resistentes pela eficiente apresentação de antígenos e estímulo à produção de citocinas de padrão Th1, propõe-se investigar seu papel na PCM humana.

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar as características *in vitro* de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose.

2.2 Específicos

- a) Diferenciar *in vitro* células dendríticas a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose;
- b) Analisar as características das células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose, com relação à expressão de moléculas de superfície e à produção de citocinas e quimiocinas;
- c) Comparar as diferenças entre as células dendríticas de pacientes com paracoccidioidomicose e as células dendríticas de indivíduos saudáveis.

CASUÍSTICA
MATERIAIS E MÉTODOS



3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram incluídos no estudo 20 (vinte) pacientes com PCM ativa (AP), 25 (vinte e cinco) pacientes com PCM tratada (TP) e 25 (vinte e cinco) indivíduos sadios para constituição do grupo controle (CO). Os pacientes foram provenientes do Ambulatório de Micoses Sistêmicas ou da Enfermaria da Clínica de Moléstias Infecciosas Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e participaram do estudo voluntariamente (CAPPesq 1087/04), após preenchimento de consentimento informado, de acordo com a resolução No. 196/96 do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

3.2 Critérios de inclusão

Os seguintes critérios de inclusão foram utilizados:

a. PCM ativa (AP): identificação de *P. brasiliensis* por exame micológico e/ou histopatológico e/ou presença de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* com títulos \geq 32 (contraimunoeletroforese).

b. PCM tratada (TP): presença de anticorpos anti- *P. brasiliensis* com títulos ≤ 4 , em duas coletas num período de 6 meses, com doença comprovada no passado por identificação do fungo por exame micológico e/ou histopatológico e/ou presença de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* com títulos ≥ 32 (contraimuno eletroforese).

c. Grupo controle (CO): indivíduos considerados sadios sem história prévia da doença, não sensibilizados em ensaios de linfoproliferação frente à glicoproteína de 43 kDa de *P. brasiliensis* e ausência de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* (imunodifusão).

Foram excluídos pacientes com comorbidade como tuberculose, neoplasias e outras doenças infecciosas sistêmicas agudas e crônicas, como histoplasmoze, aspergilose e leishmaniose.

Tabela 1. Distribuição dos pacientes com paracoccidioidomicose ativa (AP) e tratada (TP), e indivíduos sadios (CO), segundo gênero, idade, grupo e formas clínicas, aguda (AG) ou crônica (CR).

	Gênero (%)	Idade (anos \pm DP ^a)	Grupo (n)				
			CO (25)	AP (20)		TP (26)	
				AG	CR	AG	CR
Masculino	95,74%	45,6 \pm 13,6	22	2	16	3	22
Feminino	4,26%	45,2 \pm 10,2	3	1	1	0	1
Total (n)	71		25	3	17	3	23

^a DP = desvio padrão

3.3 Diferenciação das células dendríticas derivadas de monócitos aderidos à placa de cultura (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994)

Para a obtenção de células dendríticas derivadas de monócitos (DCs), cerca de 80 mL de sangue total de pacientes e indivíduos sadios foram diluídos à proporção de 1:2 em meio RPMI 1640 e as células mononucleares do sangue periférico separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque densidade $1.077 \approx 1.078$ (centrifugação a 1250 g por 20 minutos a 10 °C). Após dois ciclos de lavagem (centrifugação a 300 g por 10 minutos a 10 °C), as células mononucleares foram ajustadas à concentração de 1×10^7 células/mL e incubadas em meio RPMI 1640 a 37 °C e 5 % de CO₂ por 2 horas em placas de 6 poços, acrescentando-se 1,5 mL da suspensão celular/poço. Após incubação, células não aderentes foram retiradas e as células aderentes foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 40 mg/mL de gentamicina, 200 mM de L-glutamina e 10 % de soro fetal bovino, contendo 50 ng/mL de GM-CSF e 50 ng/mL de IL-4 recombinantes. No dia 3, as culturas receberam reforço das citocinas recombinantes em meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina e soro fetal bovino.

3.4 Diferenciação das células dendríticas derivadas de monócitos por seleção magnética positiva de células CD14⁺

As células mononucleares foram separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque, como descrito no item 3.3, a partir de cerca de 80 mL de sangue periférico de pacientes com PCM tratada e indivíduos saudáveis. Após os dois ciclos de lavagem e ajuste à concentração de 1×10^7 células/mL em meio RPMI 1640, a suspensão celular foi dividida em duas partes idênticas. Uma das partes foi distribuída em placas de 6 poços e incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂ por 2 horas para aderência das células, e processadas como no item 3.3. Paralelamente, a outra parte foi ressuspensa em 80 µL de solução de PBS com 0,5% de albumina sérica bovina e 2 mM de EDTA para cada 1×10^7 do total de células. A marcação das células foi realizada com 20 µL de CD14 micropérolas (*Human CD14 Microbeads*, Miltenyi Biotec) para cada 1×10^7 do total de células e incubação por 15 minutos a 4 °C, segundo indicações do fabricante. Adicionou-se 1 a 2 mL do tampão para cada 1×10^7 do total de células e centrifugou-se a 300 g por 10 minutos para retirada de excesso de micropérolas não-ligadas às células. O sobrenadante foi retirado, as células ressuspensas em 500 µL para cada 1×10^8 do total de células e essa suspensão foi aplicada em coluna magnética tipo MS acoplada ao aparato separador (VarioMACS, Miltenyi Biotec). As células marcadas com as micropérolas ficaram retidas na coluna, enquanto que as não-marcadas foram coletadas em um tubo fixado abaixo da coluna. As células CD14⁺ foram recuperadas em outro tubo após retirada da coluna do aparato e subsequente lavagem desta com o tampão.

As células CD14⁺ foram contadas, ajustadas à concentração de 1×10^6 células/mL, ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 40 mg/mL de gentamicina, 200 mM de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino, contendo 50 ng/mL de GM-CSF e 50 ng/mL de IL-4 recombinantes, e distribuídas em placas de 6 poços.

No dia 3, as duas culturas, de células aderentes e células CD14⁺, receberam reforço das citocinas recombinantes em meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina e soro fetal bovino.

3.5 Estímulo das células dendríticas

Ao dia 6 do ensaio, as DCs diferenciadas a partir de monócitos aderidos à placa de cultura (CD11c⁺/CD1a⁺/CD14⁻) foram contadas, ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 40 mg/mL de gentamicina, 200 mM de L-glutamina e 10 % de soro fetal bovino, contendo 50 ng/mL de GM-CSF e 50 ng/mL de IL-4 recombinantes, e ajustadas à concentração de 1×10^6 células/mL em placas de 24 poços. As DCs foram tratadas com 50 ng/mL de TNF- α (DC+TNF) ou deixadas sem tratamento (nDC), e mantidas a 37 °C e 5 % de CO₂ por 48 horas.

No dia 8, as células foram marcadas para análise da expressão de moléculas de superfície com o anticorpo anti-molécula de interesse, e os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados a -70 °C para posterior dosagem da citocinas.

3.6 Estímulo de células dendríticas de indivíduos sadios com sobrenadantes da cultura de células dendríticas de pacientes com PCM tratada

As células dendríticas de pacientes com PCM tratada obtidas paralelamente pelo método de aderência e por separação magnética positiva foram ajustadas à concentração de 1×10^6 células/mL em placas de 24 poços e estimuladas ao 6º dia com 50 ng/mL de TNF- α ou deixadas sem tratamento, e mantidas a 37 °C e 5 % de CO₂ por 48 horas. No dia 2 da cultura de células de pacientes, deu-se início aos mesmos procedimentos para a cultura de células dos indivíduos sadios. O dia 6 dessas culturas coincidiu com o dia 8 das culturas de células dos pacientes. Nesse momento, as células dendríticas dos pacientes foram centrifugadas, os sobrenadantes das culturas foram coletados e as células foram marcadas com anticorpos anti-moléculas de superfície para análise por citometria de fluxo. As células dos indivíduos sadios foram ajustadas à concentração de 1×10^6 células/mL em placas de 24 poços e estimuladas com 50 ng/mL de TNF- α , com o sobrenadante das culturas dos pacientes (80% do volume final) adicionados ou não de 50 ng/mL de TNF- α , ou deixadas sem tratamento, e incubadas a 37° C e 5% de CO₂ por 48 horas. O sobrenadante sobressalente foi armazenado a 70° C para posterior dosagem de citocinas.

Após 48 horas de incubação, as células dos indivíduos sadios foram marcadas com anticorpos anti-moléculas de superfície, e os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados a -70° C para posterior dosagem da citocinas.

3.7 Caracterização das células dendríticas

No dia 8 das culturas, as DCs foram recuperadas e ressuspensas em solução de PBS com 1% de soro fetal bovino, e os sobrenadantes congelados para posterior dosagem de citocinas. As células foram ajustadas à concentração de 10^5 células/100 μ L em microtubos, um para cada dupla de anticorpos anti-molécula de superfície. As DCs foram caracterizadas através da análise da expressão dos seguintes anticorpos anti-molécula de expressão humana marcados com os fluorocromos FITC ou PE, nas quantidades recomendadas pelos respectivos fabricantes: anti-CD11c-FITC, anti-HLA-DR-FITC, anti-CD1a-PE, anti-CD86-FITC, anti-CD80-PE, anti-CD14-FITC (Caltag®) ou anti-DC-SIGN-PE (R&D Systems®), além dos controles de isótipos, IgG1-FITC e IgG1-PE.

Os microtubos com as células adicionadas de anticorpos foram incubados a 4 °C e protegidos de luz por 30 minutos. O excesso de anticorpos não-ligados às células foi retirado com 3 ciclos de lavagens com solução de PBS com 1% de soro fetal bovino e centrifugação de 300 g por 10 minutos. As DCs foram finalmente ressuspensas em solução fixadora de PBS com 2% de glicose e 1% de formaldeído e mantidas a 4 °C até aquisição em citômetro de fluxo.

Para a análise no citômetro de fluxo, as células foram centrifugadas a 300 g por 10 minutos e ressuspensas em tampão PBS. Os resultados obtidos foram representados pela porcentagem de células positivas e Intensidade Média de Fluorescência (IMF) para cada molécula estudada.

3.8 Detecção das citocinas IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-1 β e IFN- γ em sobrenadantes de cultura

A detecção dos níveis de citocinas IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-1 β e IFN- γ (BD Biosciences®) em sobrenadante de cultura foi realizada em ensaio de ELISA, utilizando-se anticorpos específicos para captura e detecção destas substâncias, segundo o fabricante.

Os anticorpos monoclonais de captura anti-IL-10, anti-IL-12p40, anti-IL-12p70 anti-IL-1 β ou anti-IFN- γ humanos 1:250 foram diluídos em tampão Carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5 e aplicados 50 μ L/poço em microplaca de meia-área de 96 poços. A microplaca foi selada e incubada por 18 horas a 4° C.

A microplaca foi aspirada e lavada três vezes com PBS com 0,05% de Tween-20, pH 7,2 \approx 7,4; e após a última lavagem, a microplaca foi invertida e batida levemente sobre papel absorvente para remover resíduos. Os poços foram bloqueados com 150 μ L/poço de PBS com 10% de soro fetal bovino, pH 7,0 e incubados por uma hora a temperatura ambiente.

Após esse intervalo, o procedimento de lavagem citado foi repetido. As amostras foram diluídas 1:2 em PBS com 10% de soro fetal bovino e estas aplicadas 50 μ L/poço, em duplicata. A curva padrão recomendada tem seu ponto mais alto em 500 pg/mL para IL-10, IL-12p70 e IL-1 β , 2000 pg/mL para IL-12p40 e 1000 pg/mL para IFN- γ , com seis pontos em diluição seriada; as diluições foram aplicadas 50 μ L/poço em duplicata de cada concentração, e 50 μ L/poço em duplicata de PBS com

10% soro fetal como um dos controles (“branco”) da reação. A microplaca foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente.

Passadas 2 horas, o procedimento de lavagem foi repetido, cinco vezes. Para IL-10, IL-12p40, IL-12p70 e IFN- γ , os anticorpos monoclonais biotinizados de detecção anti-IL-10 ou anti-IL-12p40 ou anti-IL-12p70 ou anti-IFN- γ humanos foram diluídos 1:250 em PBS com 10% de soro fetal bovino e nesta solução, a estreptoavidina-HRP (estreptoavidina-*horseradish* peroxidase conjugada), também a 1:250. A solução foi aplicada 50 μ L/poço e a microplaca foi incubada por uma hora a temperatura ambiente. Para IL-1 β , o anticorpo monoclonal biotinizado anti-IL-1 β humana de detecção foi diluído 1:250 em PBS com 10% de soro fetal bovino e aplicado 50 μ L/poço; a microplaca foi incubada por uma hora.

Para IL-10, IL-12p40, IL-12p70 e IFN- γ , o procedimento de lavagem foi repetido, sete vezes, deixando os poços com o tampão de 30 segundos a 1 minuto entre cada lavagem. Para IL-1 β , a estreptoavidina-HRP foi diluída 1:250 em PBS com 10% de soro fetal bovino e aplicados 50 μ L/poço; a microplaca foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, repetindo o procedimento de lavagem, sete vezes, ao final do intervalo de tempo determinado.

Foram adicionados 50 μ L/poço do substrato tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio e a microplaca foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, protegida da luz. Foram então adicionados 25 μ L/poço de H₂SO₄ 2 N para parar a reação e a leitura da absorbância da microplaca realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, subtraída desse resultado, o valor a 570 nm.

Os resultados são automaticamente calculados pelo “software” SoftMax Pro, em “pg/mL”.

3.9 Detecção da quimiocina CCL18 em sobrenadantes de cultura

Os procedimentos realizados para o ensaio de dosagem da quimiocina humana CCL18 foram recomendados pelo fabricante (R&D Systems®).

O anticorpo monoclonal anti-CCL18 humana de captura foi diluído em PBS pH 7,2 \approx 7,4 à concentração final de 1 μ g/mL e aplicados 50 μ L/poço à microplaca de 96 poços. A microplaca foi incubada por 18 horas à temperatura ambiente.

A microplaca foi aspirada e lavada com PBS com 0,05% de Tween-20 pH 7,2 \approx 7,4 por três vezes; ao final da última lavagem e aspiração, inverteu-se a microplaca e bateu-se levemente sobre papel absorvente para remover resíduos. Os poços foram bloqueados com 150 μ L/poço de PBS com 1% de albumina sérica bovina pH 7,2 \approx 7,4 e incubados por no mínimo uma hora a temperatura ambiente.

O procedimento de lavagem e aspiração da microplaca foi repetido. As amostras foram diluídas 1:4 em PBS com 1% de albumina sérica bovina e aplicados 50 μ L/poço, em duplicata. A curva padrão recomendada tem seu ponto mais alto em 500 pg/mL e seis pontos em diluição seriada com PBS com 1% de albumina sérica bovina; para cada diluição foram aplicados 50 μ L/poço em duplicata de cada concentração, e 50 μ L/poço em duplicata de PBS com 1% de albumina sérica bovina

como “branco” da reação. A microplaca foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente.

Após as 2 horas, o processo de lavagem e aspiração da microplaca foi repetido. O anticorpo monoclonal biotilado anti-CCL18 humana foi diluído em PBS com 1% de albumina sérica bovina à concentração final de 50 ng/mL e aplicados 50 µL/poço desta solução. A microplaca foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente.

Passadas 2 horas, o processo de lavagem e aspiração da microplaca foi repetido. A estreptoavidina-HRP foi diluída 1:250 em PBS com 1% de albumina sérica bovina, aplicados 50 µL/poço desta solução e a microplaca, incubada por 20 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz. Ao final desse intervalo de tempo, o processo de lavagem e aspiração foi repetido, foram aplicados 50 µL/poço de substrato TMB e peróxido de hidrogênio e a microplaca, incubada por mais 20 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz.

Foram adicionados 25 µL/poço de H₂SO₄ 2 N e realizada a leitura da absorbância da microplaca em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm e subtraído desse resultado, o valor a 570 nm.

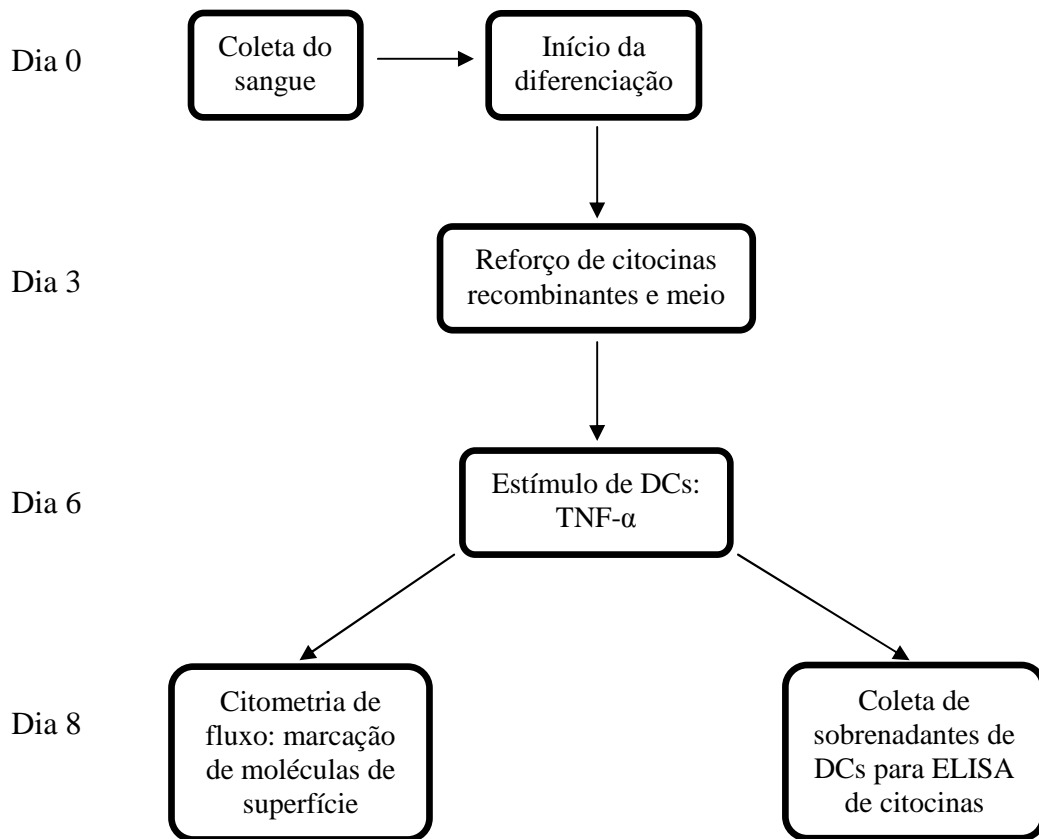
Os resultados são automaticamente calculados pelo “software” SoftMax Pro, em “ng/mL”.

3.10 Análises dos resultados

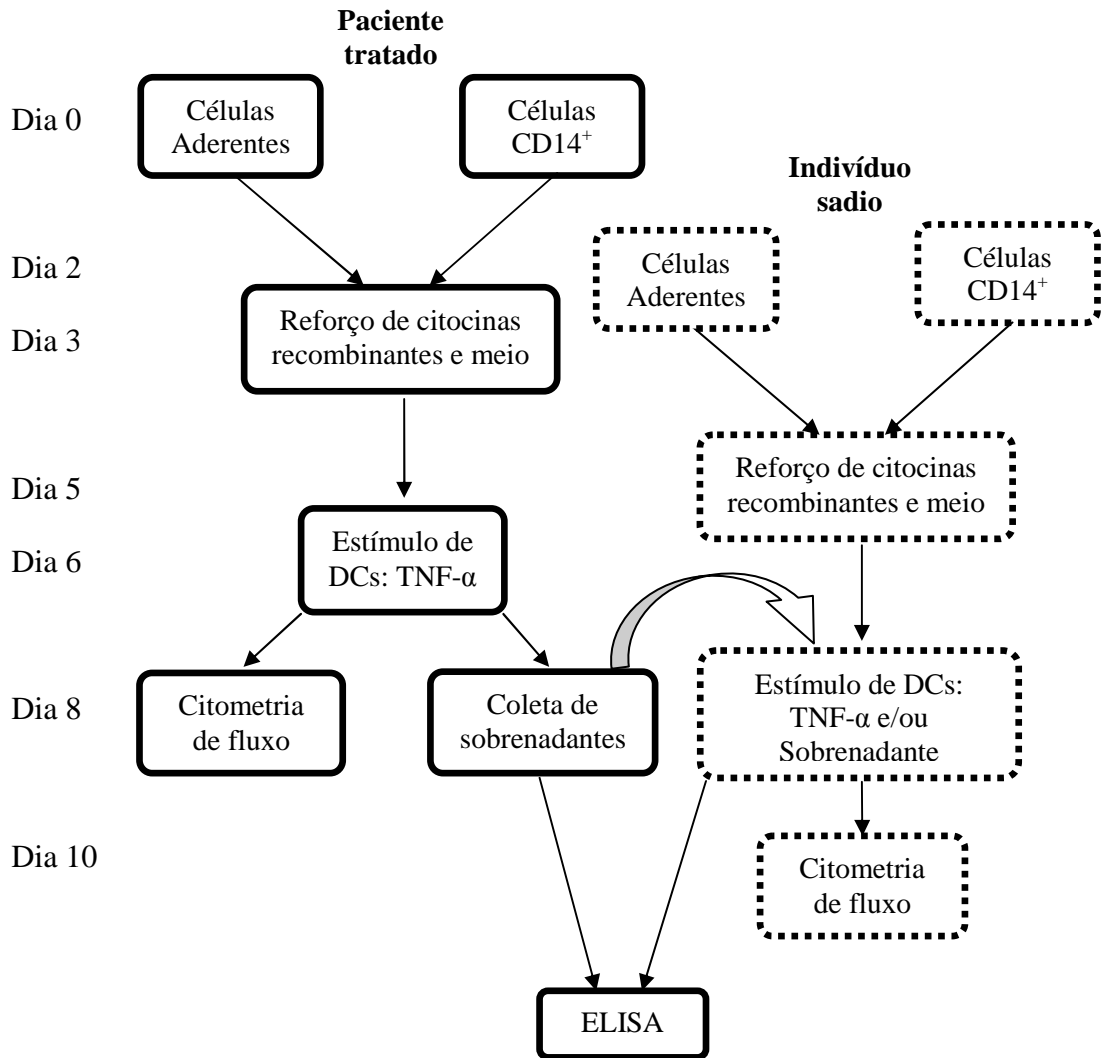
Para a observação das variações estatisticamente significantes, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn para as diferenças entre os grupos, e o teste de Mann-Whitney para as diferenças entre células tratadas ou não-tratadas com TNF- α e/ou sobrenadantes de culturas, calculados no software GraphPad-Prism 5. Os resultados foram representados como média com erro padrão da média (SEM) e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.11 Esquema geral dos experimentos

3.11.1 Experimento principal



3.11.2 Experimento secundário



RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1. Padronização dos ensaios de diferenciação de células dendríticas

Com o objetivo de padronizar o protocolo de diferenciação de células dendríticas (DCs), experimentos preliminares foram realizados no sentido de avaliar a capacidade de diferenciação de DCs a partir de monócitos bem como reconhecer o perfil de células dendríticas não-tratadas (nDC), CD11c⁺, CD1a⁺, CD14⁻, e células ativadas por TNF- α (DC+TNF), CD11c⁺, HLA-DR^{high}, CD86^{high} e CD14⁻. Para tanto avaliamos a expressão de moléculas de superfície características e constitutivas das DCs, quais sejam CD11c, CD1a e HLA-DR, e posteriormente, as co-estimulatórias CD86 e CD80, e DC-SIGN.

A Figura 1 ilustra o perfil celular típico obtido por citometria de fluxo, em análise de “density plot” com relação às características de tamanho (eixo de abscissas) e granulosidade (eixo de ordenadas). Observa-se a presença de pelo menos 2 populações distintas, uma delas menor e menos granulosa, constituída por restos celulares e linfócitos, e, em destaque, uma população de células maiores e mais granulosa, apresentando características de monócitos. Esta população foi definida como nossa população de estudo, delimitada pela área R1 (“gate”), sendo que para os experimentos foi considerado um mínimo de 10.000 eventos presentes nesta população.

Também foi analisada a expressão de marcadores celulares, representados sob a forma de percentual de células positivas (Figura 2A) e Intensidade Média de Fluorescência (IMF) (Figura 2B). A Figura 2 ilustra um resultado representativo de experimentos realizados com células de 3 indivíduos sadios (variação <10%).

Observa-se que células expressando a molécula CD11c, característica de DCs de origem mielóide, constituem quase que a totalidade da população estudada (no mínimo 70% do total de células presentes no “gate”), tanto de nDC quanto de DC+TNF. Além disso, observou-se a presença de uma pequena quantidade de células positivas para CD14 (cerca de 1 a 2%), expresso por monócitos, mas ausente em células dendríticas, refletindo a presença de algumas células que não sofreram diferenciação (dados não mostrados). Tomados em conjunto, e considerando a expressão de CD11c e CD1a e baixa expressão de CD14 estes resultados demonstram que houve uma diferenciação expressiva (de pelo menos 95%) de células dendríticas a partir dos monócitos de sangue periférico.

A análise da intensidade média de fluorescência (IMF) para estes marcadores demonstra que a presença de TNF- α leva ao aumento da expressão da molécula MHC-classe II, para a qual foi utilizado anticorpo anti-HLA-DR, observou-se a expressão desta molécula em cerca de 80% das células analisadas. Além disso, também se observou aumento tanto na porcentagem de células positivas quanto na IMF da molécula CD86 após o tratamento com TNF- α .

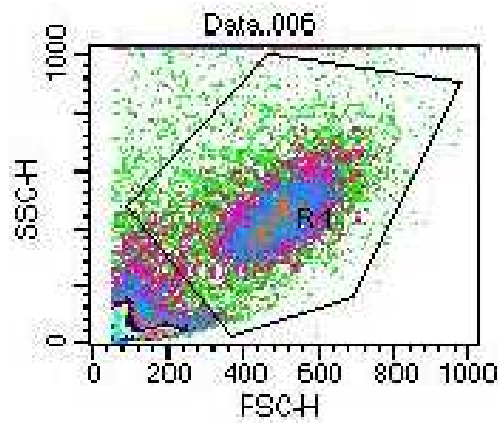


Figura 1: Perfil em citometria de fluxo de células dendríticas derivadas de monócitos de sangue periférico de indivíduo sadio

Perfil característico de populações celulares presentes na cultura de células dendríticas derivadas de monócitos em análise por citometria de fluxo, segundo características de tamanho (abscissa) e granulosidade (ordenada). A população delimitada pela área R1 (“gate”) representa células com características de monócitos, considerada como população de estudo.

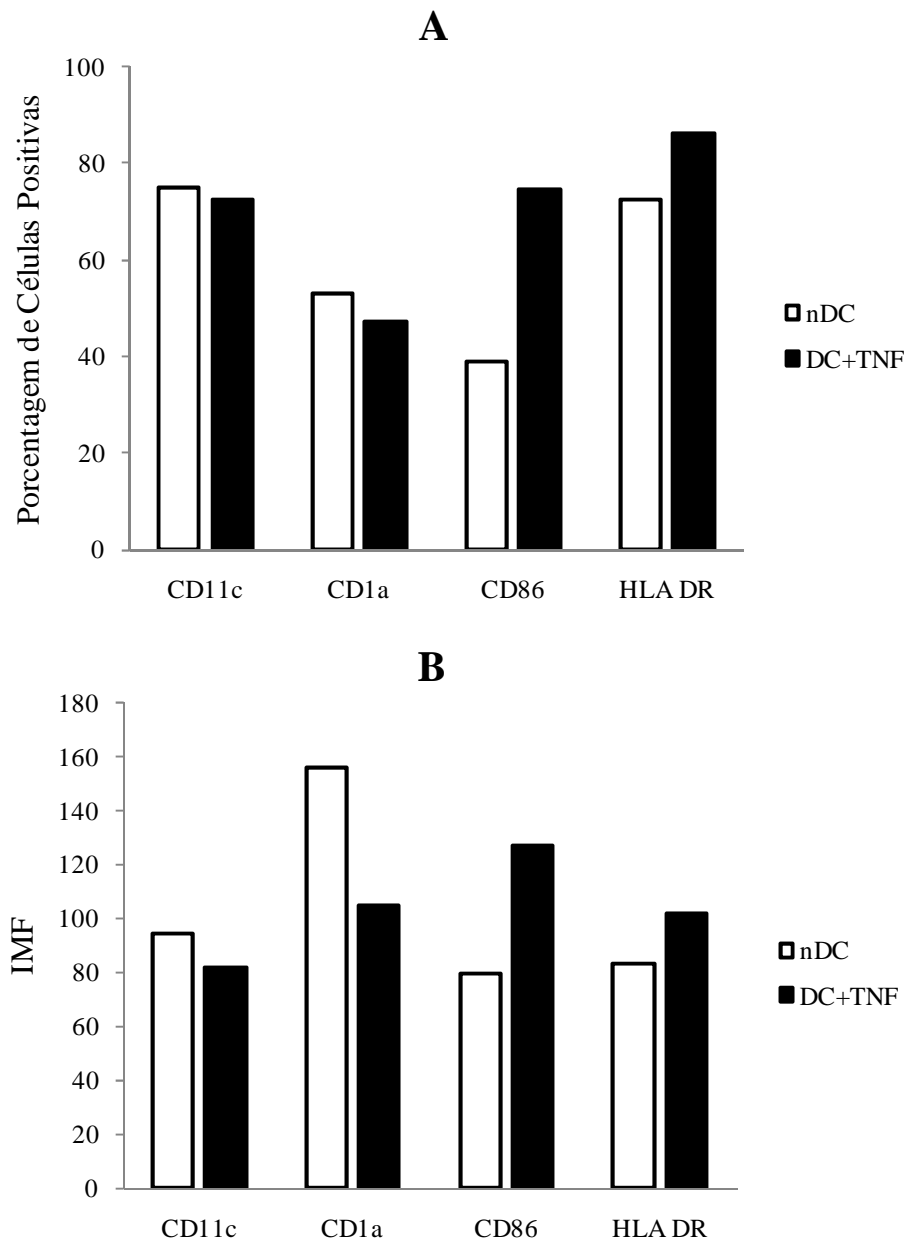


Figura 2: Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos

Análise de percentual de células positivas (A) e IMF (B) para os marcadores CD11c, CD1a, CD86 e HLA-DR, analisadas em população definida na área R1 (“gate”). Células não-tratadas (nDC) originam-se de monócitos estimulados para diferenciação em células dendríticas, obtidas no 6^o dia de cultura e sem aplicação de outro tratamento e, quando tratadas com TNF- α por 48 horas, se tornam células ativadas (DC+TNF). Resultados de um indivíduo sadio (representativo de 3 experimentos isolados de 3 indivíduos sadios, com variação <10%).

4.2 Comparação da expressão de moléculas de superfície de células dendríticas derivadas de monócitos entre grupos de indivíduos sadios e pacientes com PCM

Após a padronização dos protocolos de diferenciação e ativação das DCs derivadas de monócitos, procedeu-se à análise de expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo, comparando-se a porcentagem de células positivas e a Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de cada molécula estudada entre os grupos de 17 indivíduos sadios (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP).

4.2.1 Expressão da molécula CD11c

Na Figura 3, estão representados os resultados observados na análise da expressão da molécula CD11c. Não encontramos diferenças significativas nos percentuais de células positivas para a molécula tanto entre os diferentes grupos estudados quanto entre os estímulos utilizados (Figura 3A). Comprovou-se também que as células-alvo do trabalho são células dendríticas pela elevada porcentagem média de positividade de CD11c e expressão de CD14 < 5 % (molécula característica de monócitos – dados não mostrados).

- **CD11c**

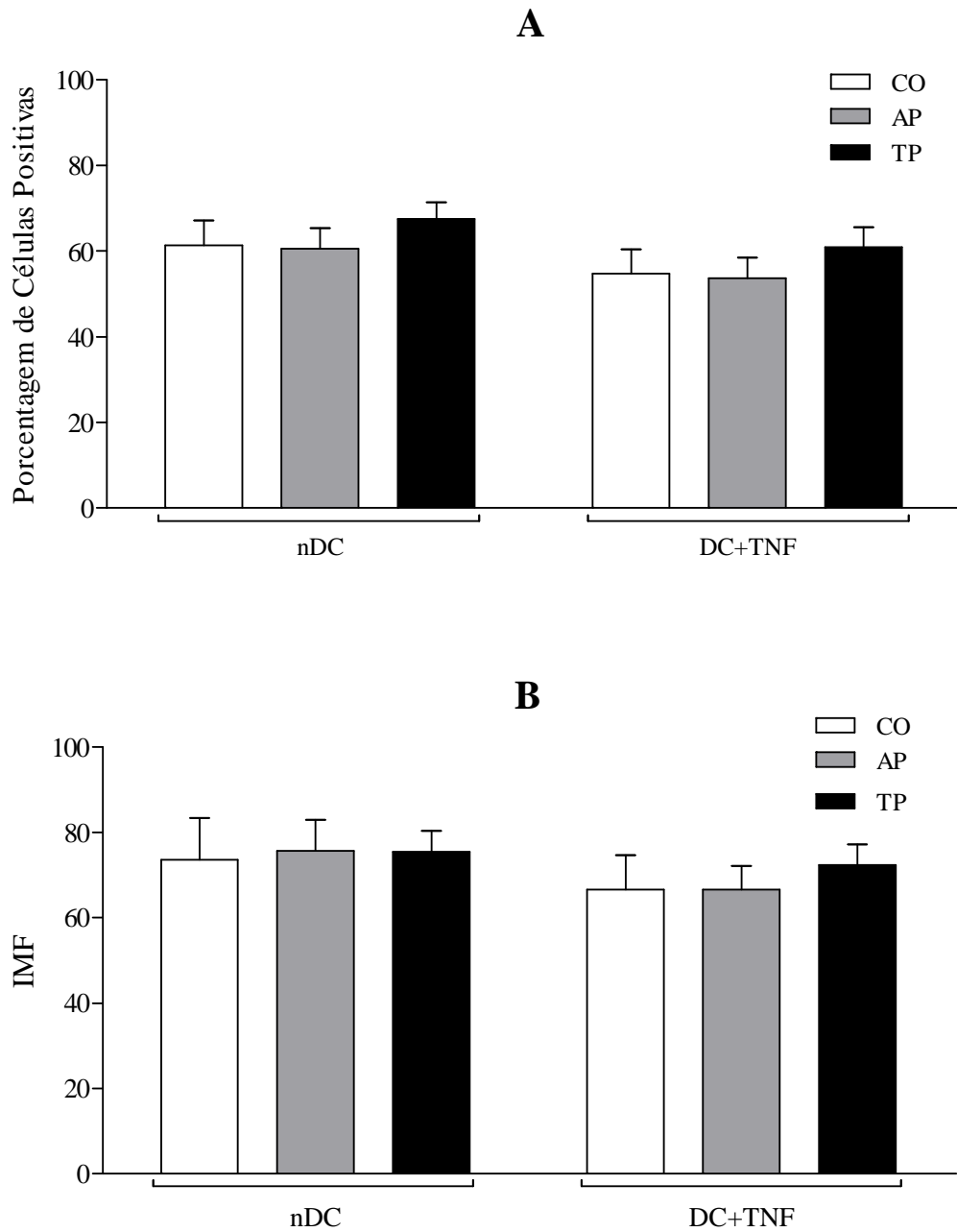


Figura 3: Percentual de células CD11c positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos saudáveis (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com erro padrão da média .

4.2.2 Expressão da molécula CD1a

No estudo da expressão da molécula CD1a (Figura 4), não se observaram diferenças significantes entre os grupos quanto à porcentagem de células positivas ou à IMF, embora o grupo CO tenha apresentado percentual relativamente mais elevado que os outros grupos.

Quanto à IMF, DC+TNF de todos os grupos expressaram menos CD1a que as células não-tratadas (nDC), porém, sem haver diferença estatisticamente significante (Figura 4B).

- **CD1a**

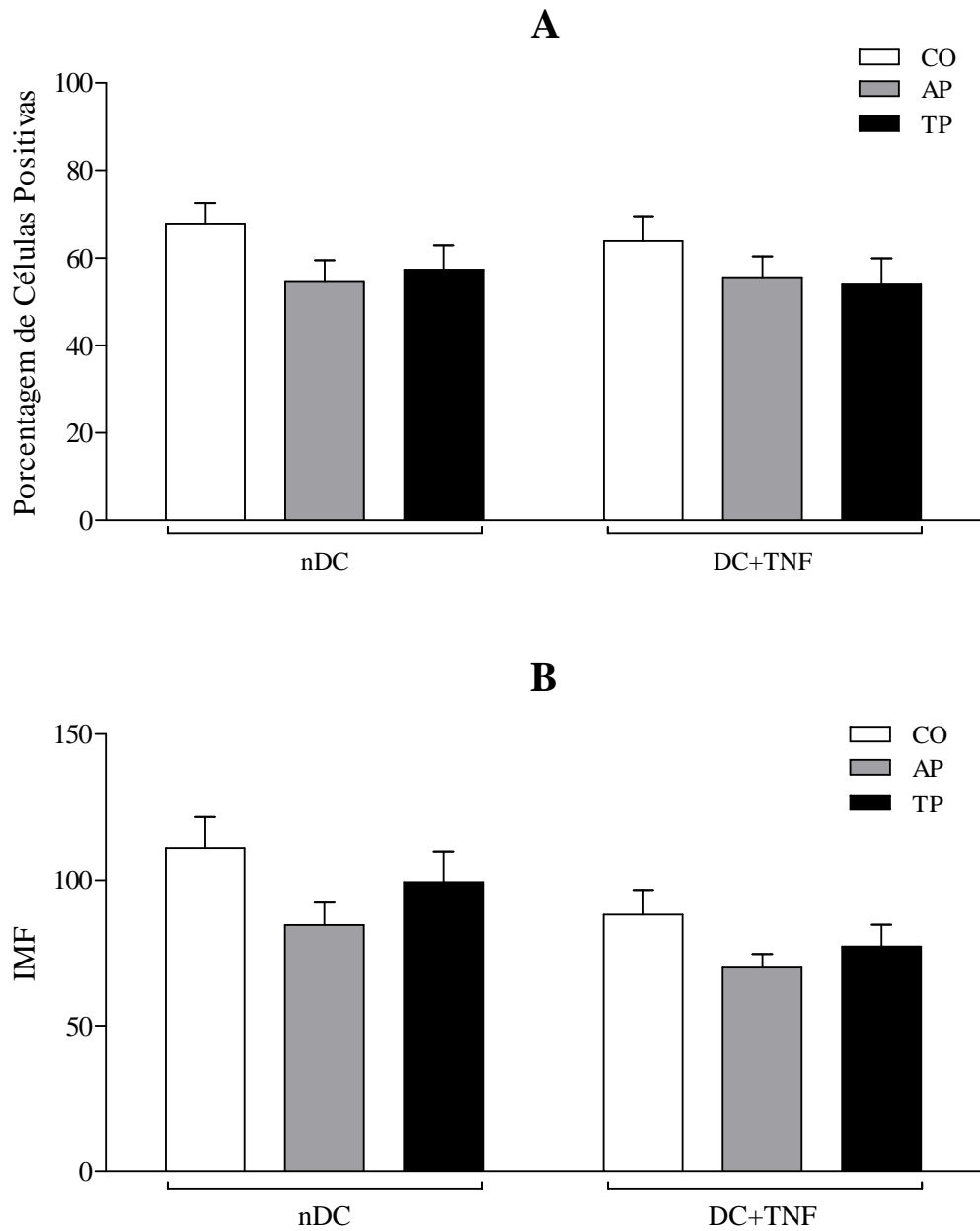


Figura 4: Percentual de células CD1a positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos saudáveis (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM.

4.2.3 Expressão da molécula HLA-DR

A molécula de MHC-classe II estudada, HLA-DR, está presente exclusivamente em APCs, sendo essencial na apresentação de frações peptídicas dos antígenos processados pelas DCs, com maior expressão em células amadurecidas e ativadas com TNF- α . Assim, investigou-se a possibilidade de diferentes expressões dessa molécula nos pacientes com PCM em relação aos indivíduos sadios e os resultados estão representados à Figura 5. Observou-se que o percentual de células positivas para a molécula (Figura 5A) foi semelhante em todos os grupos (cerca de 80%). A ativação com TNF- α mostrou aumento significativo de células positivas no grupo CO ($p=0,0496$).

Na Figura 5B, estão representados os resultados na análise da IMF para a HLA-DR. É possível observar que as células dos grupos CO e AP parecem ter comportamento semelhante, com IMF semelhante na presença ou não de TNF- α . As células do grupo TP, quando comparadas tanto a AP quanto CO, expressam mais HLA-DR, ativadas ou não ($p<0,05$).

- HLA-DR

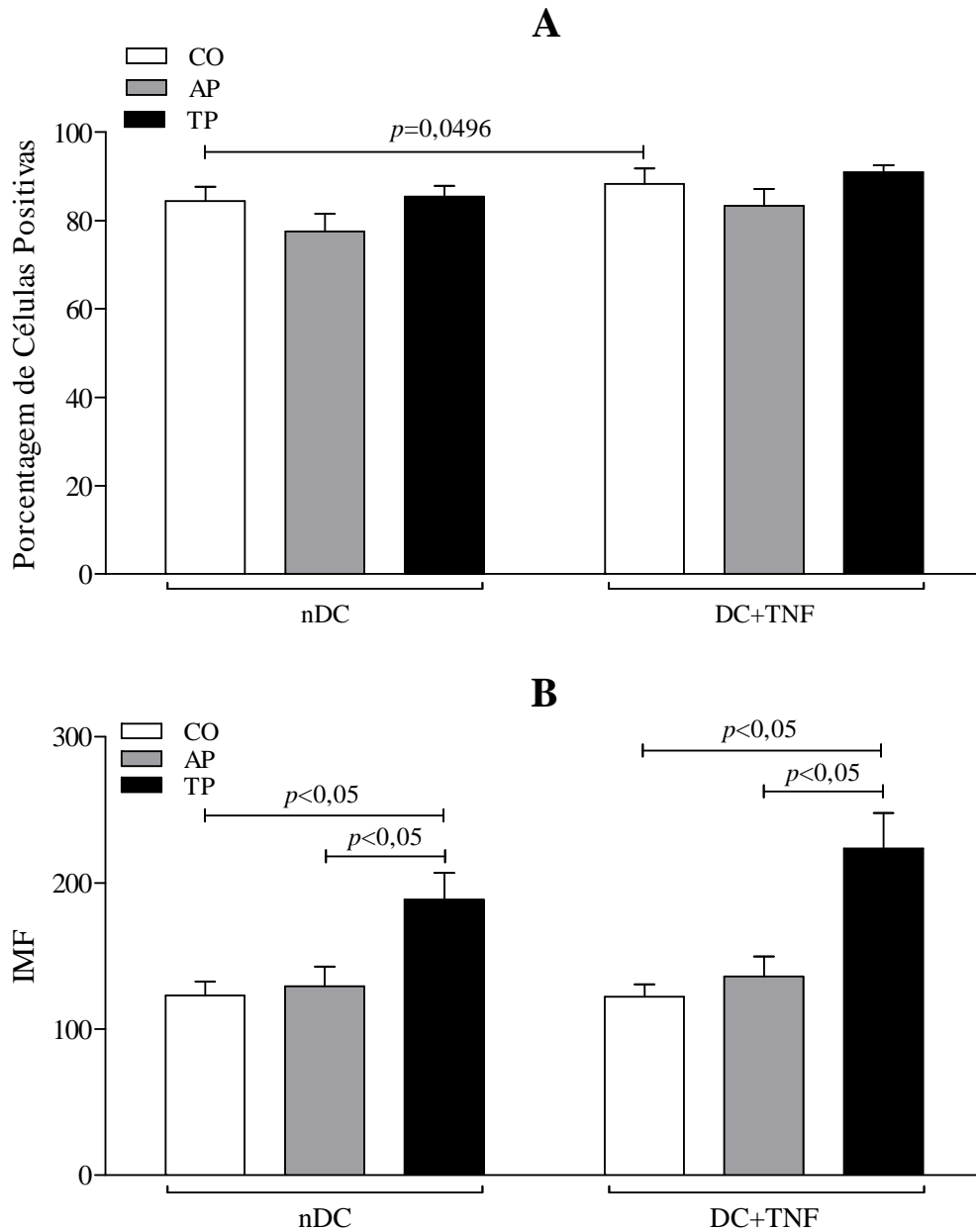


Figura 5: Percentual de células HLA-DR positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos saudáveis (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significativas indicadas quando $p<0,05$.

4.2.4 Expressão da molécula CD86

Durante a apresentação do antígeno, as DCs ligam-se aos linfócitos através do complexo MHC-peptídeo e de moléculas co-estimulatórias, CD86 e CD80, que definem o tipo de resposta efetora das células T. Desse modo, investigou-se a expressão dessas moléculas em pacientes com PCM e as diferenças em relação aos indivíduos saudáveis.

Na análise da expressão da molécula CD86, observou-se que as células ativadas com TNF- α (DC+TNF) de todos os grupos apresentam percentuais de positividade mais elevados que as não-tratadas (nDC), que seria esperado em função da ativação pela citocina TNF- α . Estas células não-tratadas do grupo TP, apresentaram percentuais de positividade significativamente maior que as células do grupo CO (Figura 8A).

Na Figura 8B, ilustram-se os resultados da análise da IMF para CD86, onde é possível observar que DC+TNF dos grupos CO e TP apresentaram expressão significativamente maior dessa molécula em relação às não-tratadas ($p=0,0032$ e $p=0,0269$, respectivamente). Observa-se ainda que as células do grupo TP quando não-tratadas expressam mais CD86 que as células do grupo CO ($p<0,05$) e quando ativadas com TNF- α , expressam mais que o grupo AP ($p<0,05$).

- **CD86**

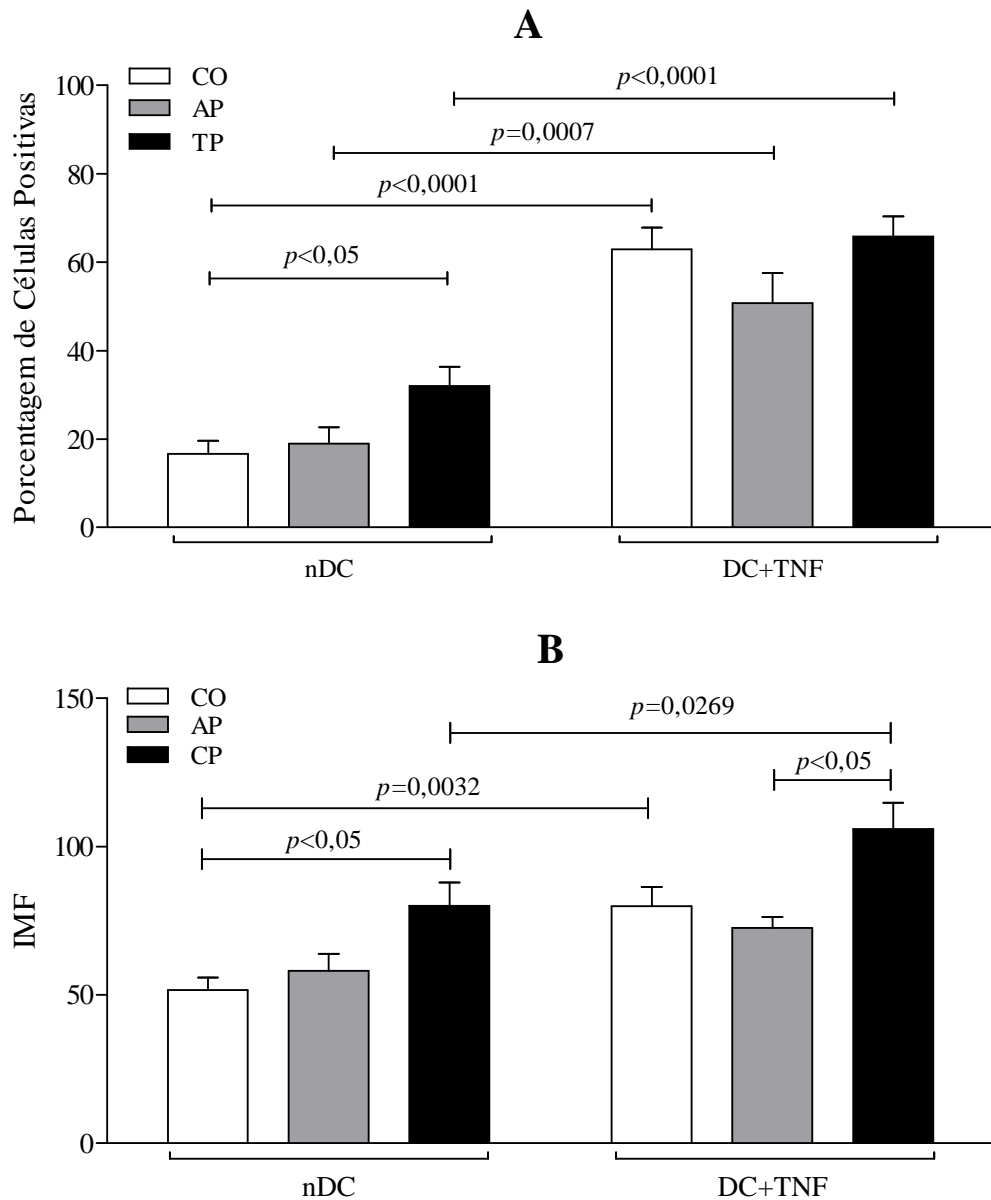


Figura 6: Percentual de células CD86 positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos saudáveis (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$.

4.2.5 Expressão da molécula CD80

Juntamente com CD86, a molécula CD80 exerce papel co-estimulatório na ligação entre as DCs e os linfócitos T, participando na definição da resposta efetora contra os antígenos de *P. brasiliensis* apresentados. Faz-se relevante, portanto, a análise da expressão dessa molécula por DCs.

Foi observado que os percentuais de células positivas para CD80 foram baixos em todos os grupos estudados e em ambos os tratamentos do experimento (Figura 7A). Curiosamente, o percentual de células positivas para a molécula nos grupos CO e TP foi significativamente mais elevado nas células não-tratadas que nas ativadas com TNF- α ($p=0,0089$ e $p=0,0147$, respectivamente), revelando um papel a ser investigado dessa citocina sobre a expressão de CD80.

Com relação à IMF, embora tenha havido decréscimo de cerca de 80 para 60 no grupo AP, não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão de CD80 entre células não-tratadas e tratadas (Figura 7B).

- **CD80**

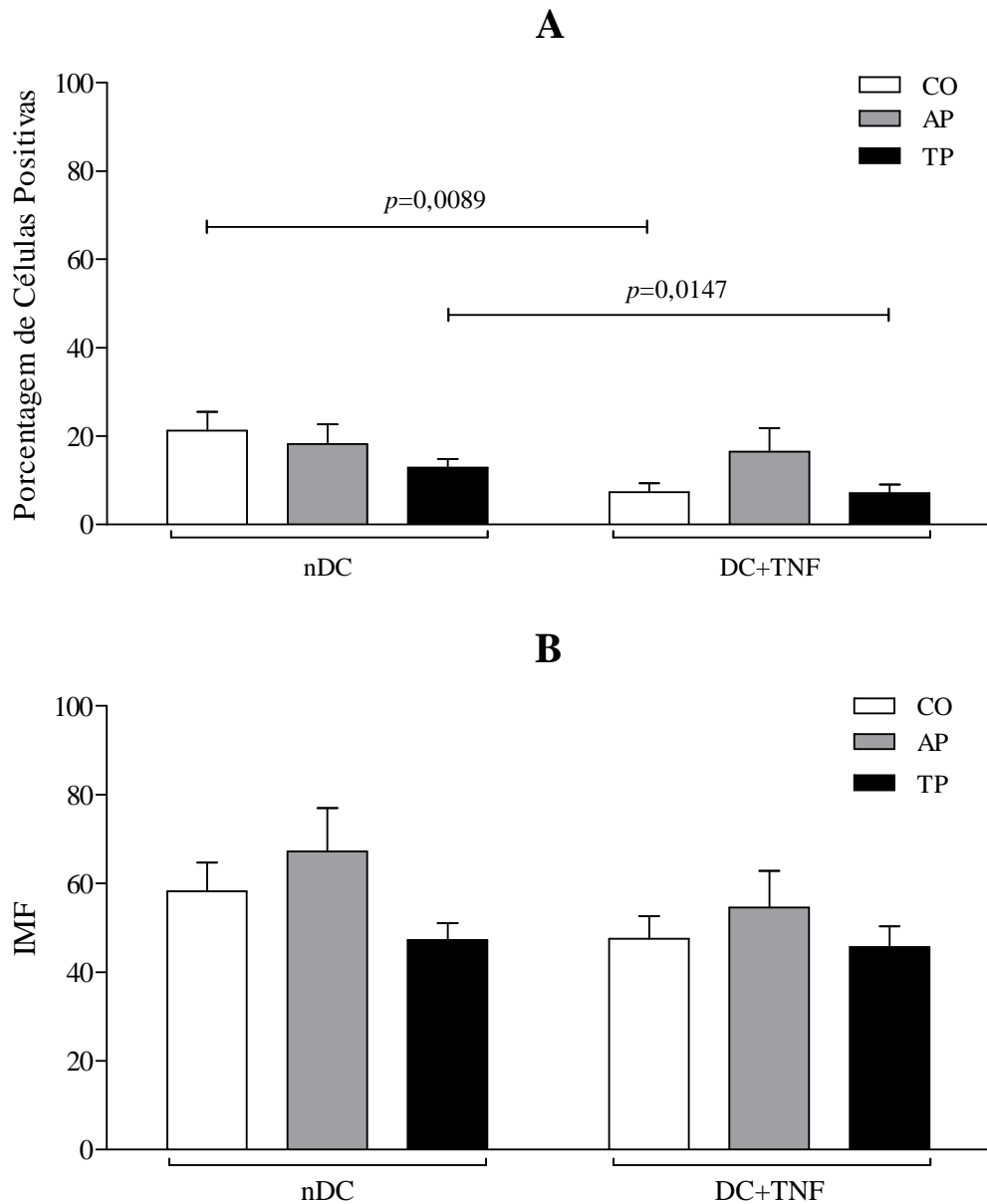


Figura 7: Percentual de células CD80 positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos saudáveis (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significativas indicadas quando $p < 0,05$.

4.2.6 Expressão da molécula DC-SIGN

A molécula DC-SIGN tem papel importante na ligação e internalização de partículas antigênicas pelas DCs, e dessa maneira, pode também modular a resposta efetora de linfócitos T. A análise da expressão dessa molécula revelou percentuais de células positivas semelhantes entre os grupos e na comparação entre células não-tratadas (nDC) e células ativadas com TNF- α (DC+TNF) (Figura 10A).

Na Figura 10B, estão representados os resultados da análise de IMF de DC-SIGN. Comparativamente à porcentagem de células positivas para a molécula, a expressão nas células de indivíduos sadios (CO) e de pacientes com PCM ativa (AP) foi praticamente constante entre os dois tratamentos utilizados. Observou-se ainda que as células não-tratadas do grupo TP expressam significativamente mais DC-SIGN que os demais grupos.

• DC-SIGN

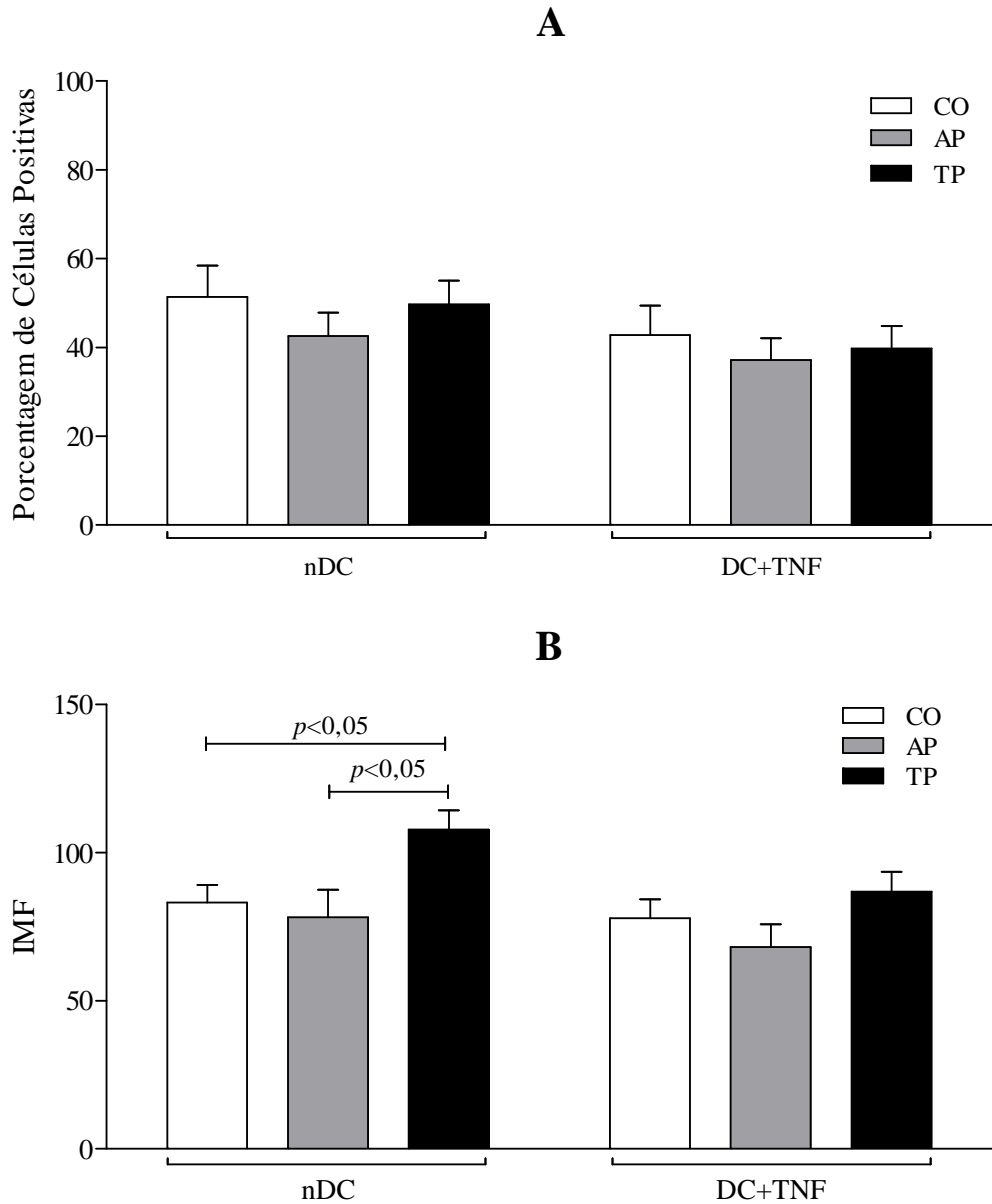


Figura 8: Percentual de células DC-SIGN positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos saudáveis (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$.

4.3 Secreção de citocinas por células dendríticas

As células dendríticas dos pacientes com PCM e dos indivíduos sadios foram deixadas em cultura por 48 horas, na presença ou não de TNF- α . Após esse período, os sobrenadantes dessas culturas foram coletados e as citocinas IL-10, IL-12p40, IL-12p70 e IL-1 β e a quimiocina CCL18 foram dosadas por ELISA. Não foram observados níveis detectáveis das citocinas IL-12p70 e IL-1 β (dados não mostrados).

4.3.1 Níveis da citocina IL-10

Na Figura 9, estão representados os resultados da dosagem da citocina IL-10. Observou-se que as DCs não-tratadas do grupo CO produzem significativamente mais a citocina que as células dos grupos de pacientes com PCM ativa (AP) ($p < 0,05$), porém, não foram observadas diferenças entre as células ativadas com TNF- α (DC+TNF) de todos os grupos.

As células não-tratadas (nDC) de todos os grupos secretaram mais IL-10 que as suas correspondentes ativadas com TNF- α (CO $p=0,0421$; AP $p=0,0262$; TP $p=0,0035$).

- **IL-10**

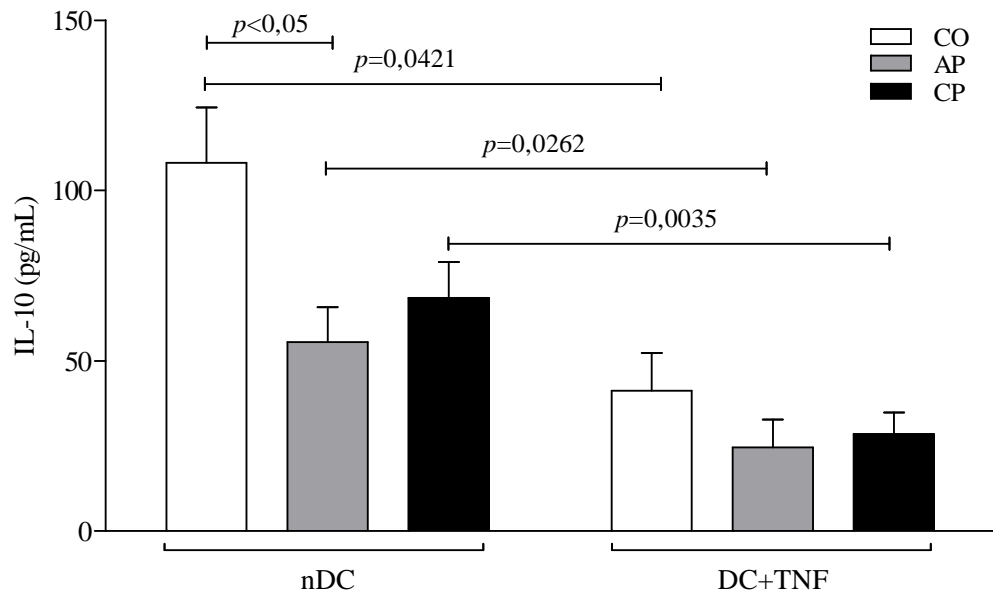


Figura 9: Níveis da citocina IL-10 (em pg/mL) em sobrenadantes de cultura de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 14 indivíduos saudáveis (CO), 15 pacientes com PCM ativa (AP) e 21 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$.

4.3.2 Níveis da citocina IL-12p40

Assim como realizado para IL-10, foi dosada a citocina IL-12p40 por ELISA de captura nos sobrenadantes de cultura de DCs não-tratadas e ativadas com TNF- α por 48 horas.

Como mostrado na Figura 10, tanto DCs não-tratadas (nDC) quanto DCs ativadas com TNF- α de pacientes com PCM tratada (TP) secretaram mais IL-12p40 que as células do grupo de pacientes com a doença ativa (AP) ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Quando observamos o efeito da presença de TNF- α nas culturas, observamos que essa citocina eleva significativamente a secreção de IL-12p40 em todos os grupos quando comparadas às NDC ($p < 0,0001$ para todos os grupos).

- IL-12p40

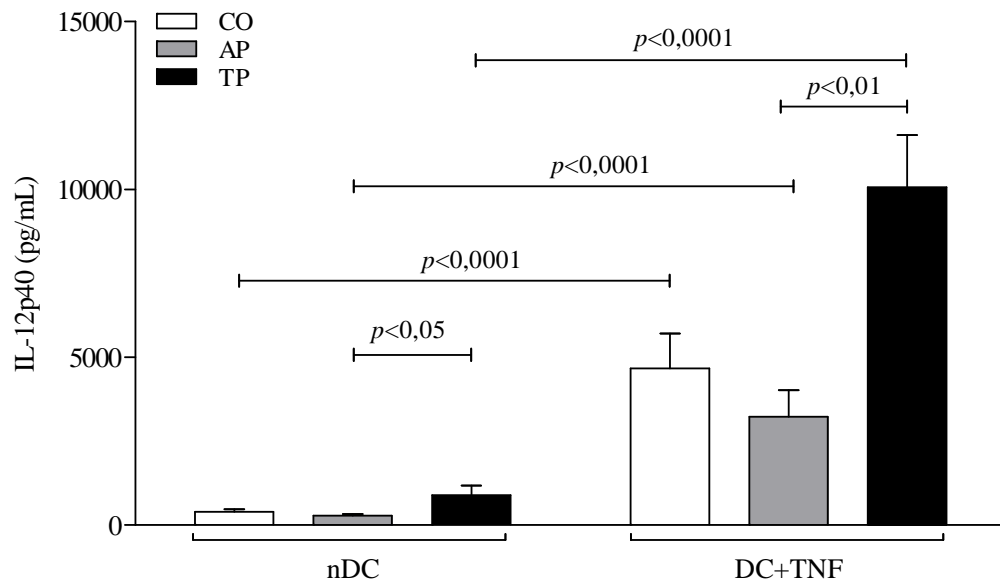


Figura 10: Níveis da citocina IL-12p40 (em pg/mL) em sobrenadantes de cultura de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 17 indivíduos saudáveis (CO), 20 pacientes com PCM ativa (AP) e 20 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$.

4.3.3 Níveis da quimiocina CCL18

Foram observadas altas concentrações da quimiocina CCL18 nas células de todos os grupos estudados, incluindo os indivíduos saudáveis. Não houve diferença nos níveis dessa quimiocina entre células não-tratadas (nDC) e células ativadas com TNF- α , como ilustrado a Figura 11. As células dos grupos de indivíduos saudáveis (CO) e de pacientes com PCM ativa (AP) apresentaram concentrações mais elevadas e homogêneas, sendo que o grupo AP secretou significativamente mais que o grupo TP ($p<0,05$).

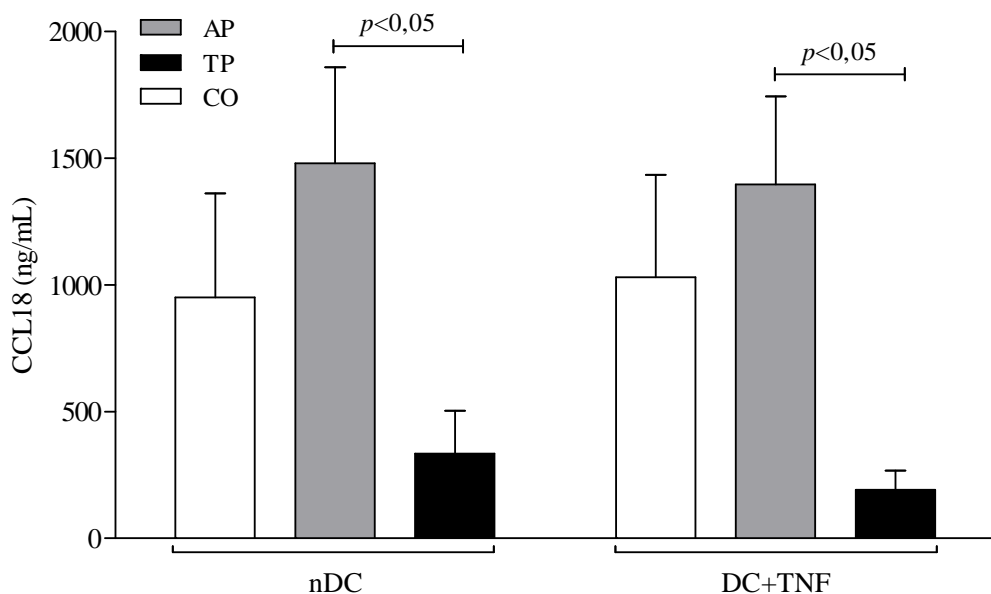


Figura 11: Níveis da quimiocina CCL18 (em ng/mL) em sobrenadantes de cultura de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 11 indivíduos saudáveis (CO), 13 pacientes com PCM ativa (AP) e 20 pacientes com PCM tratada (TP). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p<0,05$.

Tabela 2. Sumário das análises estatísticas relativas às diferenças entre as culturas de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α (DC+TNF), de pacientes com PCM ativa (AP) e PCM tratada (TP), e indivíduos saudáveis (CO).

Variável	Grupo (n)	Culturas		Valor de <i>p</i>
		1	2 ^a	
% HLA-DR	CO (17)	nDC	DC+TNF	0,0496
% CD86	CO (17)	nDC	DC+TNF	<0,0001
	AP (20)	nDC	DC+TNF	0,0007
	TP (21)	nDC	DC+TNF	<0,0001
IMF CD86	CO (17)	nDC	DC+TNF	0,0032
	TP (21)	nDC	DC+TNF	0,0269
% CD80	CO (17)	DC+TNF	nDC	0,0089
	TP (21)	DC+TNF	nDC	0,0147
IL-10	CO (14)	DC+TNF	nDC	0,0421
	AP (15)	DC+TNF	nDC	0,0262
	TP (21)	DC+TNF	nDC	0,0035
IL-12p40	CO (17)	nDC	DC+TNF	<0,0001
	AP (20)	nDC	DC+TNF	<0,0001
	TP (20)	nDC	DC+TNF	<0,0001

^a culturas com maior valor

Tabela 3. Sumário das análises estatísticas relativas às diferenças entre os grupos de indivíduos saudáveis (CO), pacientes com PCM ativa (AP) e PCM tratada (TP), segundo a cultura de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α (DC+TNF).

Variável	Culturas	Grupos		Valor de <i>p</i>
		1 (n)	2 (n) ^a	
IMF HLA-DR	nDC	CO (17)	TP (21)	<0,05
	nDC	AP (20)	TP (21)	<0,05
	DC+TNF	CO (17)	TP (21)	<0,05
	DC+TNF	AP (20)	TP (21)	<0,05
% CD86	nDC	CO (17)	TP (21)	<0,05
IMF CD86	nDC	CO (17)	TP (21)	<0,05
	DC+TNF	AP (20)	TP (21)	<0,05
IMF DC-SIGN	nDC	CO (17)	TP (21)	<0,05
	nDC	AP (20)	TP (21)	<0,05
IL-10	nDC	TP (21)	CO (14)	<0,05
IL-12p40	nDC	AP (20)	TP (20)	<0,05
	DC+TNF	AP (20)	TP (20)	<0,01
CCL18	nDC	TP (20)	AP (13)	<0,05
	DC+TNF	TP (20)	AP (13)	<0,05

^a grupos com maior valor

4.4 Efeitos dos sobrenadantes de culturas de DCs de pacientes com PCM tratada sobre as DCs de indivíduos saudáveis

Os resultados obtidos na análise citométrica das moléculas de superfície de células dendríticas revelaram maior expressão das moléculas HLA-DR (Figura 5), CD86 (Figura 6) e DC-SIGN (Figura 8) nas células de pacientes com PCM tratada em relação às células de pacientes com PCM ativa e indivíduos saudáveis. Além disso, células dendríticas de pacientes com PCM tratada também secretaram mais IL-12p40 que as células de pacientes com a doença ativa (Figura 10).

Objetivando-se esclarecer os possíveis fatores que levariam à melhor ativação das células dendríticas de pacientes tratados, mas não de células de pacientes com PCM ativa e de indivíduos saudáveis, prosseguiu-se para essa etapa do estudo.

A cultura de DCs diferenciadas de monócitos aderidos à placa pode conter outras células mononucleares, principalmente linfócitos, que, mesmo após lavagens para retirada dessas células, permanecem na incubação até o final do experimento e representam cerca de 20% do total de células (dados não mostrados). Foi realizada então uma cultura paralela de monócitos separados magneticamente com micropérolas, que apresenta > 90 % de pureza. Posteriormente, os sobrenadantes das culturas de DCs de pacientes tratados, diferenciadas tanto por aderência quanto por micropérolas, foram adicionados às culturas de células de indivíduos saudáveis.

Para avaliar a influência de linfócitos remanescentes nas culturas de DCs, realizou-se análise da expressão de moléculas de superfície e da secreção de citocinas nos sobrenadantes dessas culturas por ELISA.

4.4.1 Efeito dos sobrenadantes de culturas de DCs de pacientes sobre a expressão das moléculas de superfície de DCs de indivíduos sadios separadas por aderência ou por micropérolas

Nas Figuras 12 a 17, estão representados os resultados de percentuais de células positivas e IMF das moléculas CD11c, CD1a, HLA-DR, CD86, CD80 e DC-SIGN observados nas culturas de DCs de indivíduos sadios (barras vazias - CO) e de pacientes com PCM tratada (barras cheias - PAC), separadas por aderência (a) ou magneticamente por micropérolas (b). Foram feitas as seguintes comparações entre: DCs de indivíduos sadios (CO) e DCs de pacientes (PAC), separação por aderência (a) e separação magnética (b), DCs não-tratadas (nDC) e DCs ativadas com TNF- α (DC+TNF), DCs estimuladas com sobrenadante (SN) e DCs não-estimuladas, e DCs estimuladas com SN de aPAC e DCs estimuladas com SN de bPAC.

Os percentuais de DCs positivas CD11c (Figura 12A), CD1a (Figura 13A) e HLA-DR (Figura 14A) foram altos como esperado para essas moléculas constitutivas (>70%) e não houve diferenças significantes nas comparações realizadas. Por outro lado, a IMF de CD11c (Figura 12B) foi maior nas DCs não-tratadas (nDC) obtidas por aderência (a) em relação às DCs obtidas por micropérolas (b), com diferença significativa ($p=0,0079$) entre as células de CO, na presença ou não de sobrenadantes de PAC. Perfil semelhante foi observado na IMF de CD1a pelas células de CO (a vs b), porém sem diferenças significantes (Figura 13B). As células de PAC não apresentaram diferenças significantes entre os dois métodos de separação de monócitos para a diferenciação de DCs.

- **CD11c**

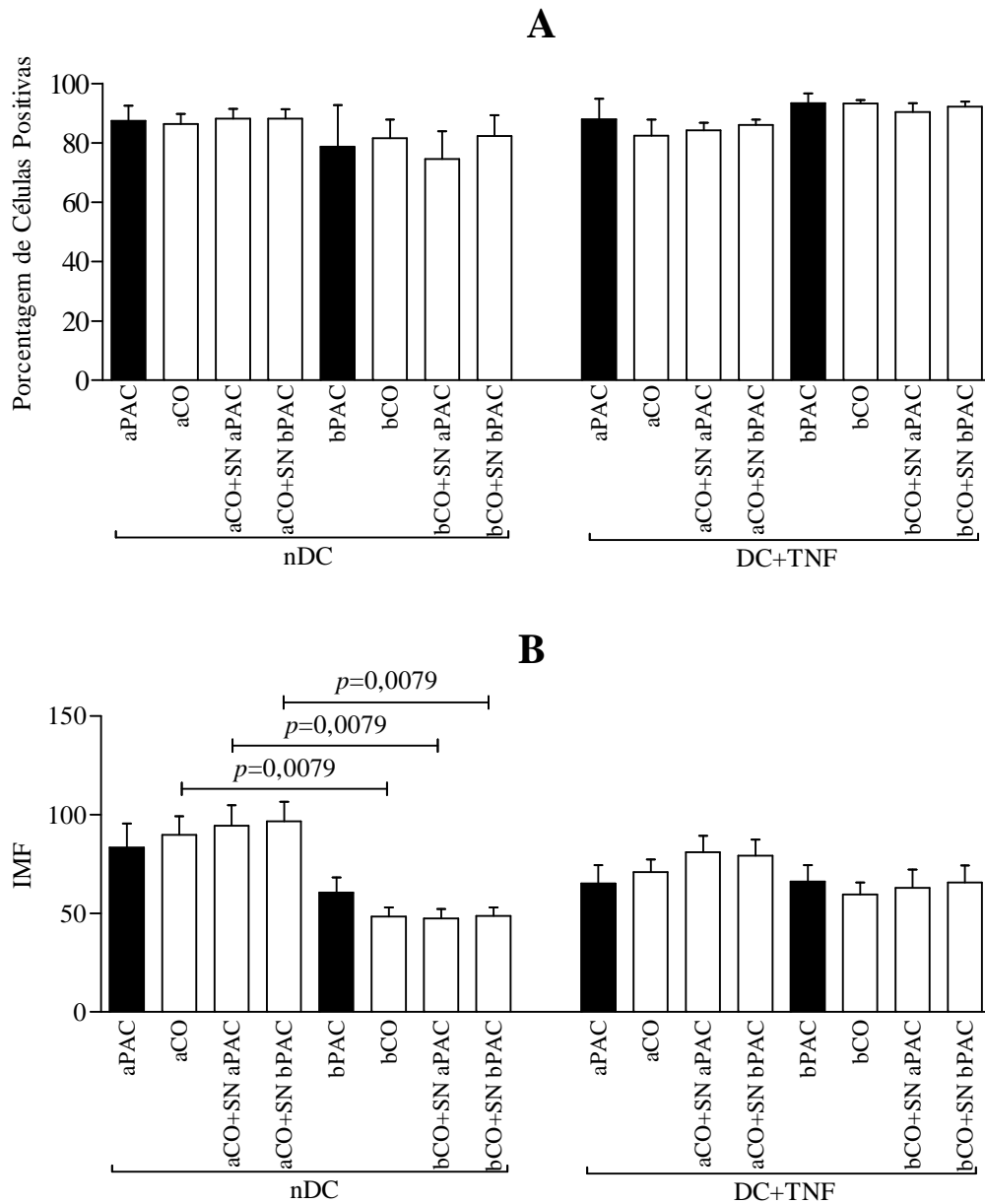


Figura 12. Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre o percentual de células CD11c positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos saudáveis (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significativas indicadas quando $p < 0,05$.

• CD1a

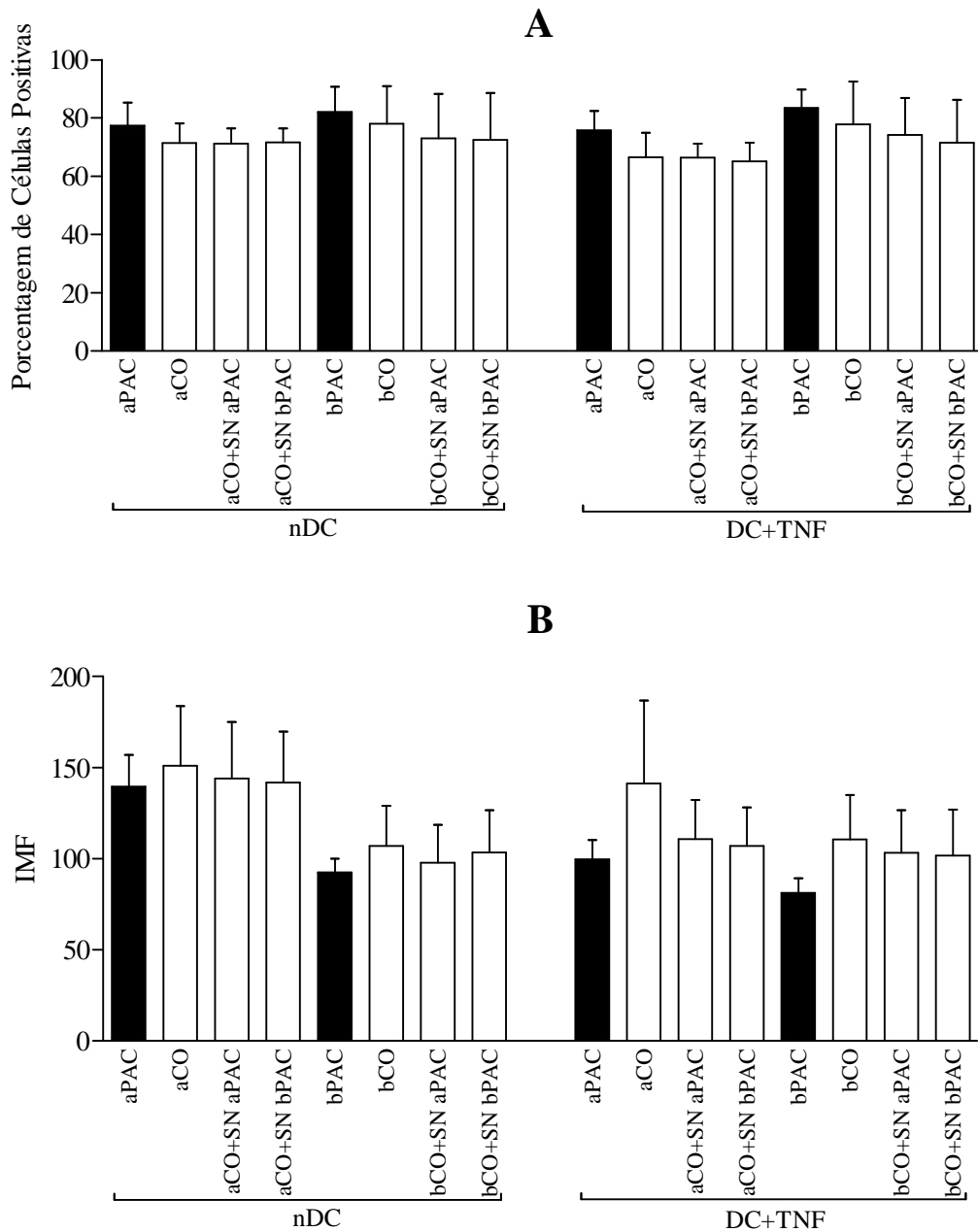


Figura 13. Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre o percentual de células CD1a positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos saudáveis (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$.

- HLA-DR

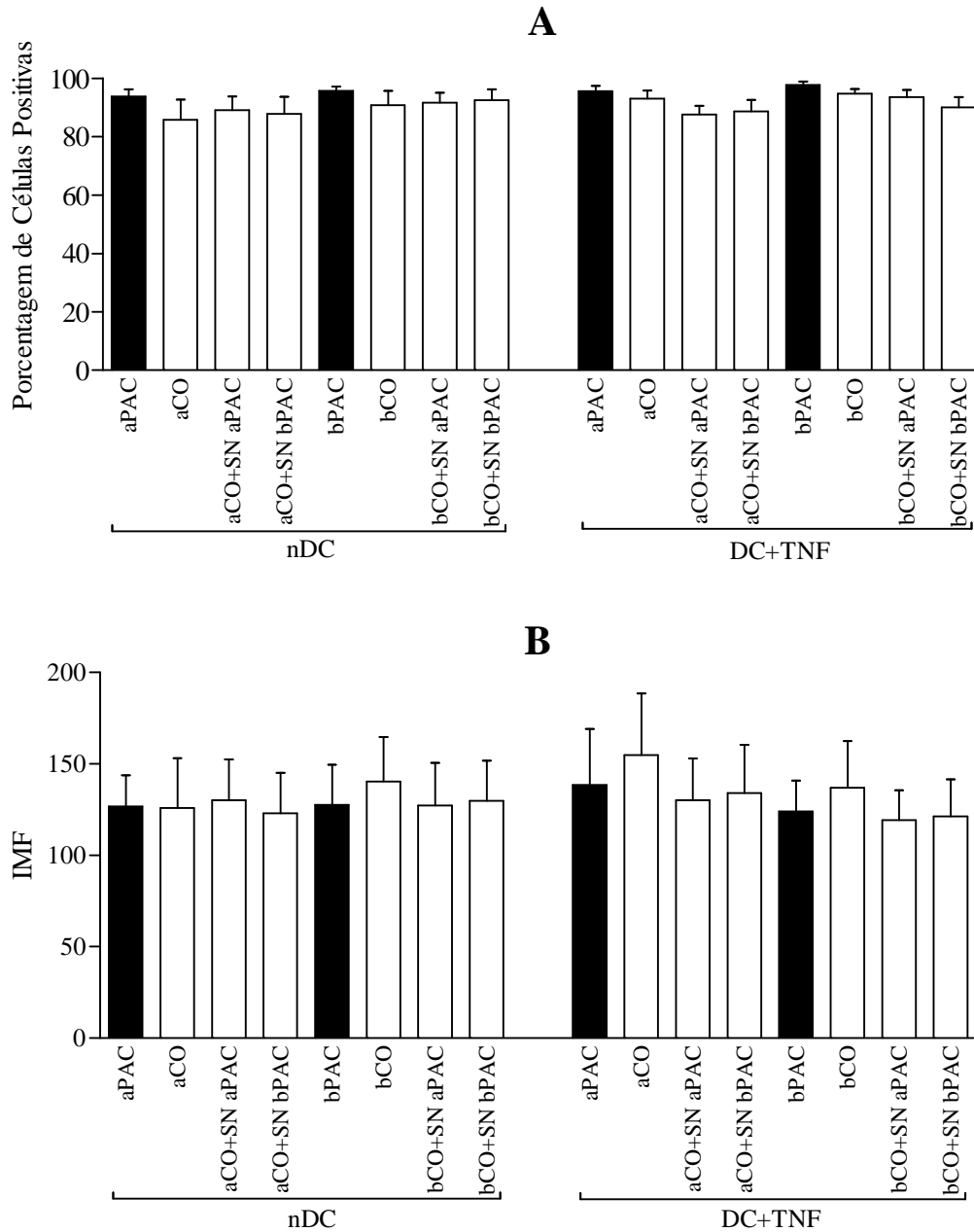


Figura 14. Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre o percentual de células HLA-DR positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos saudáveis (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando $p < 0,05$.

Na análise dos percentuais de positividade da molécula CD86 nas DCs (Figura 15A), observou-se que DCs de CO diferenciadas de monócitos aderidos (a) apresentaram expressão mais elevada da molécula que DCs diferenciadas de monócitos separados magneticamente (b), tanto na comparação entre células não-tratadas (nDC) ($p=0,0317$) quanto entre células ativadas com TNF- α (DC+TNF) ($p=0,0159$). Essa citocina foi capaz de aumentar significativamente o percentual de CD86 nas células obtidas pelos dois métodos em relação às DCs não-tratadas (a: $p=0,0159$ e b: $p=0,0317$). Com relação à IMF de CD86, foi observado aumento significativo apenas entre DC e DC+TNF de células obtidas por aderência de monócitos (a) de CO ($p=0,0079$).

Como nos resultados anteriores (Figura 7), a molécula CD80 apresentou-se com baixo percentual de positividade (<40%), com os menores valores na presença de TNF- α , e a IMF, igualmente baixa, porém semelhante em todas as situações estudadas (Figura 16).

A molécula DC-SIGN, na primeira etapa do estudo (Figura 8A), apresentou percentual de positividade nas células de todos os grupos estudados de cerca de 50%. Na segunda etapa (Figura 17A), foram observados cerca de 60% de células marcadas, de PAC e de CO. Observou-se, porém, que também não houve diferenças tanto entre PAC e CO quanto entre os diferentes tratamentos e diferentes métodos de diferenciação de DCs. Quanto à IMF de DC-SIGN, também não foram observadas diferenças com significância estatística nas comparações estudadas, porém notou-se discreto aumento nas células de CO em relação às DCs de PAC (Figura 17B).

- CD86

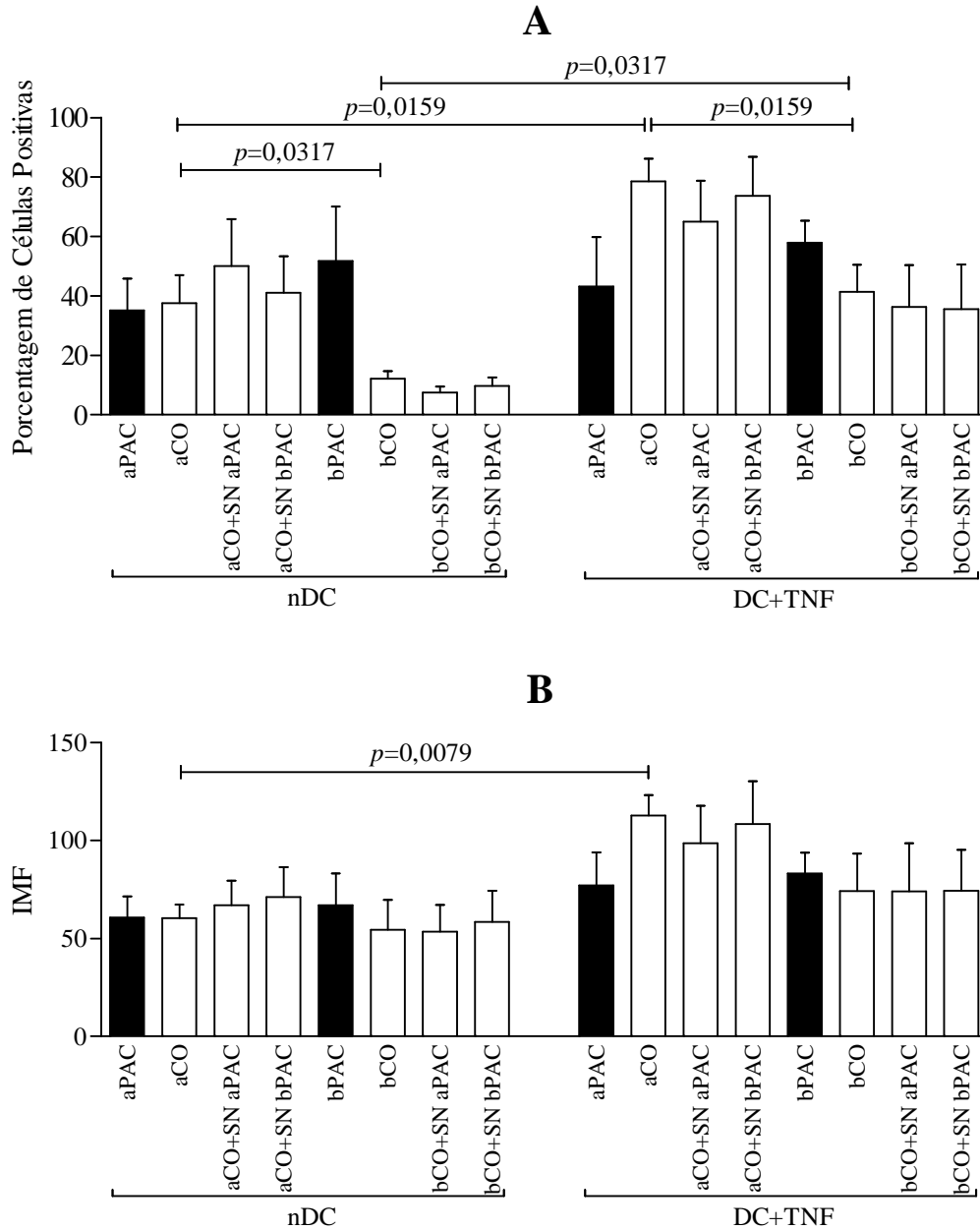


Figura 15. Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre o percentual de células CD86 positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos saudáveis (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significativas indicadas quando $p < 0,05$.

- CD80

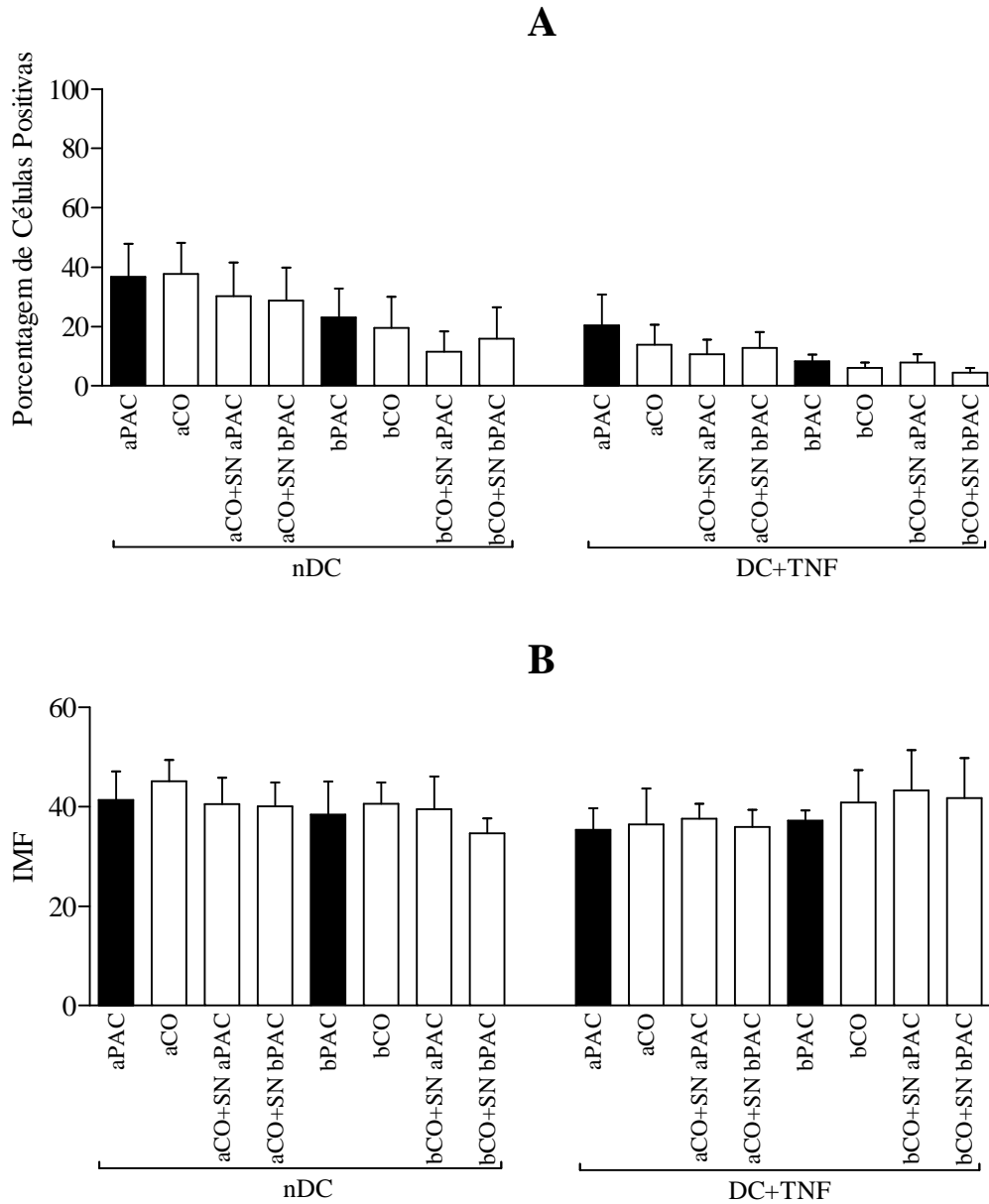


Figura 16. Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre o percentual de células CD80 positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos saudáveis (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significativas indicadas quando $p < 0,05$.

- DC-SIGN

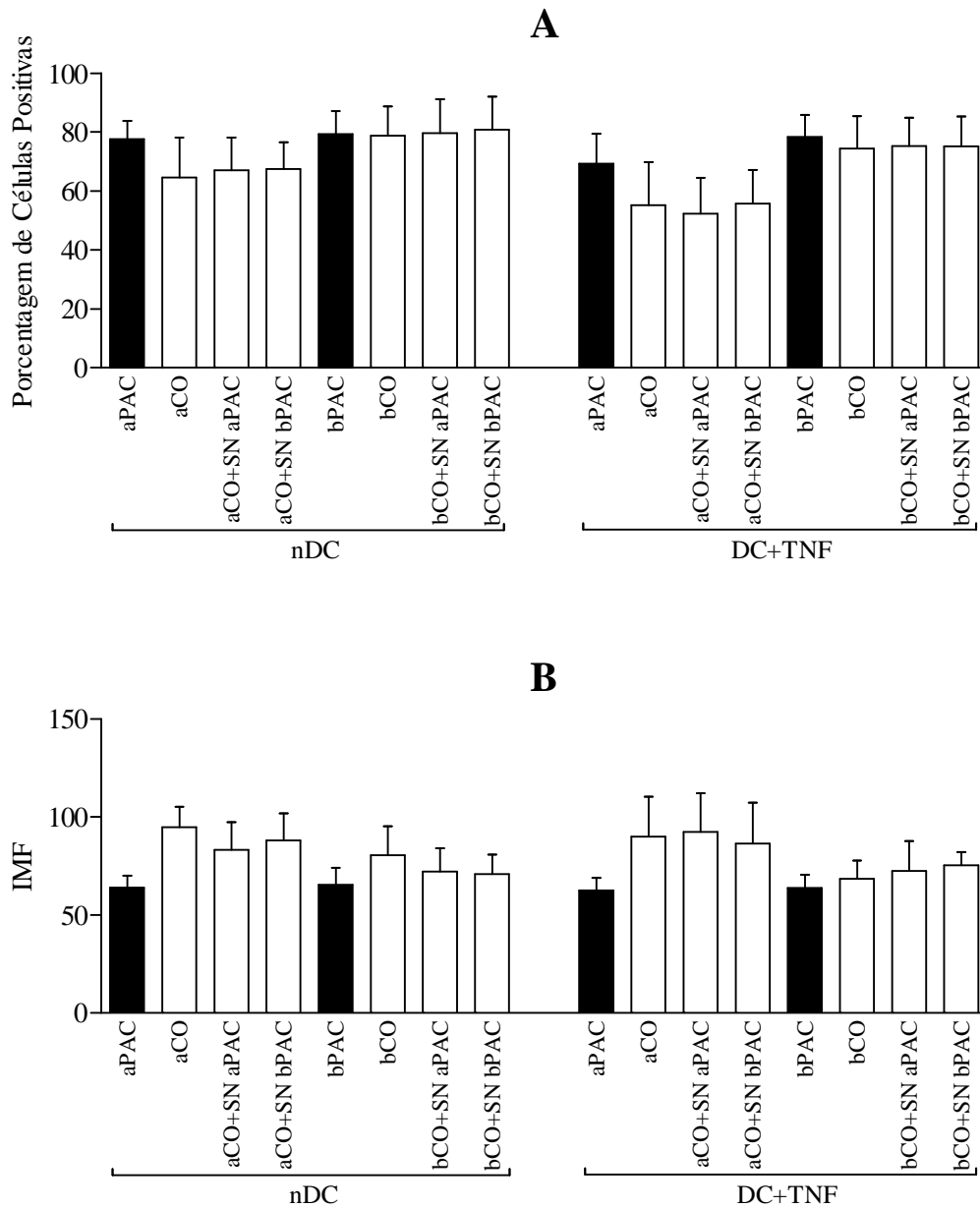


Figura 17. Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre o percentual de células DC-SIGN positivas (A) e IMF (B) de células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos saudáveis (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significativas indicadas quando $p < 0,05$.

4.4.2 Efeito dos sobrenadantes de culturas de DCs de pacientes sobre a secreção de IL-10 e IL-12p40 por DCs de indivíduos sadios separadas por aderência ou por micropérolas

Além de observar as diferenças na expressão de moléculas de superfície entre DCs de pacientes e indivíduos sadios, fez-se igualmente pertinente a avaliação da secreção de citocinas por essas células. Para tanto, os sobrenadantes as culturas de células incubadas nas condições mencionadas anteriormente (item 3.6 de Métodos) foram coletados após 48 horas e então foram realizadas as dosagens de IL-10, IL-12p40 e IFN- γ por ELISA de captura. Os ensaios para dosagens de IFN- γ não revelaram níveis detectáveis dessa citocina (dados não mostrados).

Na Figura 18, estão representadas as dosagens de IL-10. Foram observados níveis heterogêneos dessa citocina nas culturas, com concentrações maiores no grupo de indivíduos sadios (CO), porém, sem diferenças estatisticamente significantes. As culturas de DCs de pacientes (PAC) apresentaram níveis reduzidos e semelhantes entre si, sendo que as DCs não-tratadas separadas magneticamente (nDC-bPAC) não apresentaram níveis detectáveis de IL-10. As células de CO separadas por aderência (a) parecem sofrer mais a ação dos sobrenadantes de PAC, com níveis aumentados quando não-tratadas (nDC-aCO+SN aPAC e nDC-aCO+SN bPAC) em relação à DC aCO, e não-detectáveis ou reduzidos na presença de TNF- α (DC+TNF-aCO+SN aPAC e DC+TNF-aCO+SN bPAC, respectivamente), ainda que sem significância estatística. As células de CO separadas magneticamente (b), por outro lado, parecem não sofrer influência dos sobrenadantes das culturas de PAC, uma vez que os níveis

de IL-10 foram semelhantes aos observados nas culturas sem sobrenadantes, tanto de DCs não-tratadas (nDC-bCO) quanto de ativadas com TNF- α (DC+TNF-bCO).

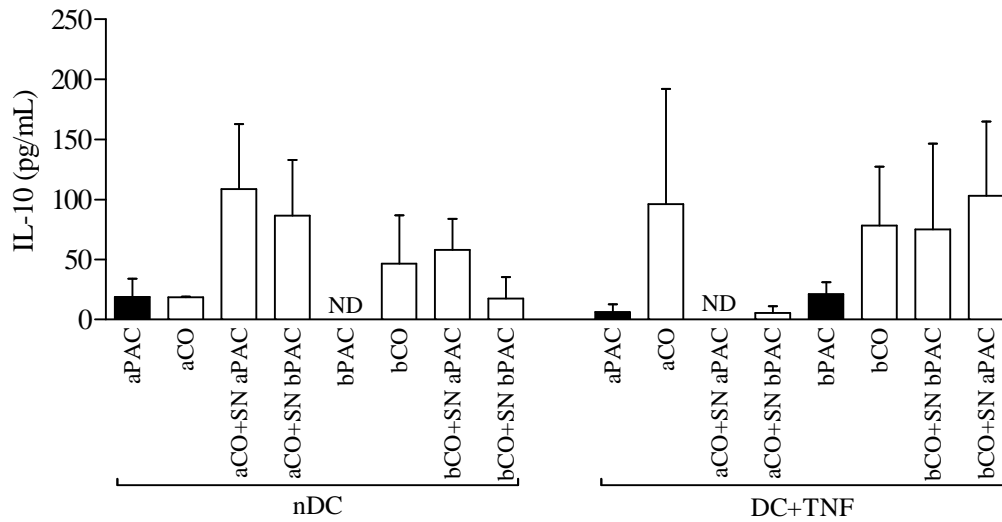


Figura 18. Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre a secreção de IL-10 por células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos saudáveis (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significativas indicadas quando $p < 0,05$ (ND = níveis não-detectados).

Na Figura 19, estão representados os resultados obtidos nos ensaios de ELISA para a dosagem de IL-12p40 nos sobrenadantes de culturas de DCs não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α (DC+TNF), diferenciadas de monócitos aderidos (a) ou separados magneticamente (b), de pacientes (PAC) e indivíduos saudáveis (CO).

Como nos resultados apresentados a Figura 10, observou-se que DC+TNF de CO e PAC secretaram significativamente mais IL-12p40 que as nDC. Na comparação entre os métodos de obtenção de DCs, observou-se que nas culturas DC de CO e de PAC, não houve diferença entre “a” e “b”. Quando ativadas com TNF- α , as DCs de CO derivadas de monócitos aderidos (aCO) apresentaram níveis maiores da citocina que as células diferenciadas de monócitos separados magneticamente (bCO) ($p=0,0159$).

Os sobrenadantes de culturas de DCs não-tratadas de PAC (aPAC e bPAC) não apresentaram altas concentrações de IL-12p40, porém, parecem aumentar a produção dessa citocina quando adicionados às culturas de DCs não-tratadas de aCO (nDC-aCO+SN aPAC e nDC-aCO+SN bPAC). Não foi observada diferença estatisticamente significativa devido à variação dos níveis da citocina entre uma cultura e outra que levou a um alto erro padrão da média (SEM). Quando os sobrenadantes de DC+TNF de aPAC e DC+TNF de bPAC foram adicionados às culturas DC+TNF de bCO, foram observados aumentos de IL-12p40 em relação às células ativadas não-estimuladas (DC+TNF-bCO), com significância estatística para aPAC ($p=0,0159$). Não foram observadas diferenças significantes entre os níveis dessa citocina na comparação entre culturas de CO e de PAC.

- IL12-p40

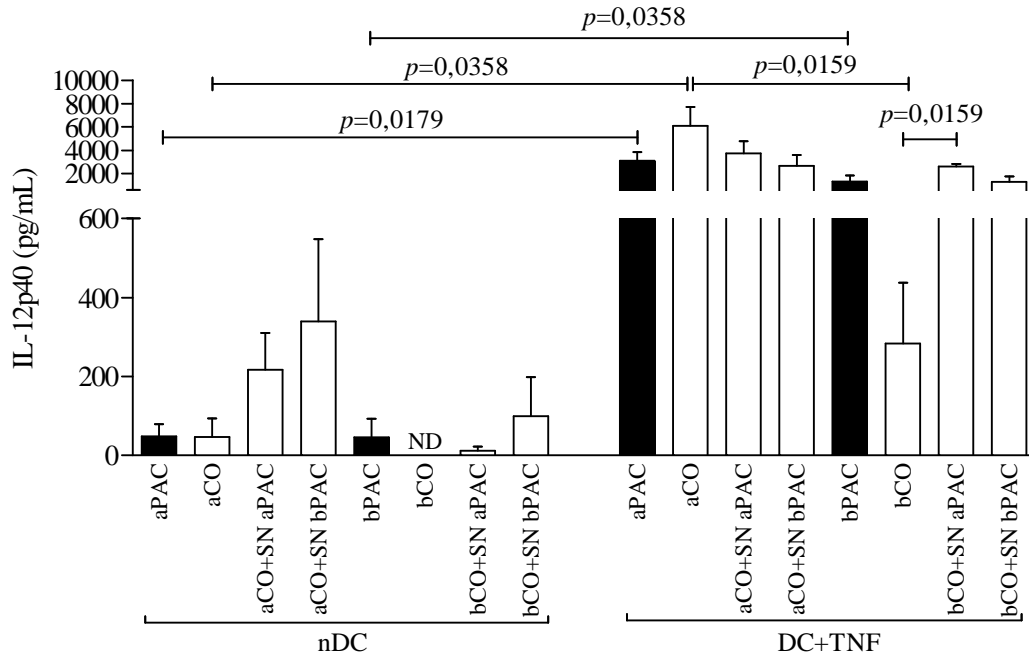


Figura 19. Efeito de sobrenadantes (SN) de culturas de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) sobre a secreção de IL-12p40 por células dendríticas, separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b), não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α por 48 horas (DC+TNF), de 5 indivíduos saudáveis (CO). Resultados representados como média com SEM e diferenças estatisticamente significativas indicadas quando $p < 0,05$ (ND = níveis não-detectados).

Tabela 4. Sumário das análises estatísticas relativas às diferenças entre as culturas de células dendríticas não-tratadas (nDC) e ativadas com TNF- α (DC+TNF), de 5 pacientes com PCM tratada (PAC) e de 5 indivíduos saudáveis (CO), separadas por aderência (a) ou por micropérolas (b).

Variável	Grupo	Culturas		Valor de <i>p</i>
		1	2 ^a	
IMF CD11c	CO	b-nDC	a-nDC	0,0079
		b-nDC+SN aPAC	a-nDC+SN aPAC	0,0079
		b-nDC+SN bPAC	a-nDC+SN bPAC	0,0079
% CD86	CO	b-nDC	a-nDC	0,0317
		a-nDC	a-DC+TNF	0,0159
		b-nDC	b-DC+TNF	0,0317
		b-DC+TNF	a-DC+TNF	0,0159
IMF CD86	CO	a-nDC	a-DC+TNF	0,0079
IL-12p40	CO	a-nDC	a-DC+TNF	0,0358
		b-DC+TNF	a-DC+TNF	0,0159
		b-DC+TNF	b-DC+TNF+SN aPAC	0,0159
	PAC	a-nDC	a-DC+TNF	0,0179
		b-nDC	b-DC+TNF	0,0358

^a culturas com maior valor

DISCUSSÃO



5. DISCUSSÃO

As células dendríticas (DCs) são consideradas apresentadoras de antígenos “profissionais”, relacionando a resposta imune inata à resposta imune adaptativa. Essas células ganharam maior destaque nos estudos a partir da década de 90, quando se desenvolveram meios de diferenciá-las a partir de monócitos do sangue periférico (Sallusto e Lanzavecchia, 1994; Romani et al., 1994; Thurner et al., 1999).

Grandes avanços têm sido alcançados no conhecimento da interação hospedeiro-parasito da PCM (Oliveira et al., 2002; Calvi et al., 2003; Cavassani et al., 2006; Ferreira et al., 2007), porém os mecanismos que envolvem o destino da infecção e sua evolução para doença em suas diferentes apresentações clínicas em humanos não são conhecidos (Sadahiro et al., 2007a, Vicentini et al., 1994, Martinez e Moya, 1992.). Tem-se descrito recentemente novos mecanismos de modulação da resposta imune celular que podem conferir maior resistência ao hospedeiro em várias micoses (Richards et al., 2002; Pietrella et al., 2008; Gafa et al., 2007). As células dendríticas, por serem excelentes apresentadoras de antígenos, poderiam ser manipuladas na tentativa de modular a resposta celular adaptativa frente a frações antígeno-específicas, através do estímulo de linfócitos para um perfil Th1 de citocinas. O significado do número aumentado de DCs no sangue periférico de pacientes com PCM ativa (Cavassani et al., 2006) e de seu papel na doença humana está longe de ser esclarecido. Neste contexto, o presente trabalho pesquisou as características *in vitro* de células dendríticas derivadas de monócitos na PCM humana.

Realizou-se a padronização da diferenciação e ativação das DCs não-tratadas tendo sendo possível obter células dendríticas a partir de monócitos de pacientes com PCM e indivíduos saudáveis. As características próprias dessas células foram confirmadas por citometria de fluxo, através da análise de uma população delimitada por tamanho e granulosidade (Figura 1), e expressão das moléculas de superfície marcadas com anticorpos específicos. Além disso, o protocolo de ativação com TNF- α recombinante para a maturação dessas células foi também eficiente, resultando em células maduras, com alta expressão da molécula co-estimulatória CD86 e do MHC-classe II, HLA-DR (Figura 2).

Com o sucesso nas etapas de diferenciação e ativação de DCs derivadas de monócitos, iniciaram-se os experimentos para a análise da expressão de moléculas de superfície de DCs de pacientes com PCM ativa ou tratada, comparada ao perfil observado em células de indivíduos saudáveis. Os resultados obtidos por citometria de fluxo mostraram que as moléculas CD11c e CD1a (Figuras 3 e 4), características de DCs de origem mielóide, são expressas de maneira similar nas células de pacientes e de indivíduos saudáveis, sugerindo que a capacidade de diferenciação de monócitos do sangue periférico em DCs, combinada à baixa expressão de CD14, não é afetada na PCM ativa e após a cura clínica. Resultados semelhantes foram obtidos de células de pacientes com coccidioidomicose disseminada (Richards et al., 2002) e cromoblastomicose (Sousa et al., 2009), porém não foram anteriormente descritos na PCM humana, segundo nosso conhecimento.

Considerando-se que a apresentação de frações antigênicas é realizada pelo contato entre as moléculas de superfície de células dendríticas e linfócitos T, estudamos os perfis de expressão de HLA-DR, CD86 e CD80. Nossos resultados

demonstraram alto percentual de positividade, esperado para HLA-DR, tanto nas células de pacientes com PCM quanto nas de indivíduos saudáveis. Por outro lado, as DCs de pacientes com PCM tratada apresentaram IMF para HLA-DR significativamente maior que os demais grupos, PCM ativa e controles (Figura 5). Sugere-se que as células de pacientes com PCM teriam maior capacidade de expressão dessa molécula, temporariamente reduzida durante a doença ativa, que poderia estar relacionada a fatores genéticos do próprio hospedeiro. De fato, Sadahiro et al. (2007a), ao estudarem a distribuição dos alelos de HLA-classe II, observaram maior frequência do alelo DRB1*11 em pacientes com PCM crônica unifocal, a forma mais localizada da doença. É possível que a frequência de determinados alelos de HLA-classe II possam igualmente definir maior expressão dessa molécula nesses pacientes após a cura clínica.

Juntamente com a análise da expressão de HLA-DR, avaliamos as moléculas co-estimulatórias, CD86 e CD80 nas células dendríticas. A adição de TNF- α às culturas de DCs aumentou o número de células expressando CD86 em todos os grupos avaliados de modo significativo (Figura 6). A intensidade da expressão, por outro lado, foi maior nos grupos de indivíduos saudáveis e de pacientes com PCM tratada, evidenciando a menor expressão de CD86 por DCs durante a doença ativa. Comparativamente às DCs de camundongos susceptíveis a PCM infectados com formas leveduriformes de *P. brasiliensis*, que sofrem diminuição da expressão de CD86 com a progressão da doença (Ferreira et al., 2007), é possível que os pacientes, durante a PCM ativa, sofram esse mesmo fenômeno, tanto pela presença do fungo quanto pela presença de antígenos solúveis secretados.

A análise da expressão de CD80 desse trabalho foi prejudicada devido ao baixo percentual e IMF dessa molécula nas células de todos os grupos estudados (Figura 7). A ativação de DCs com TNF- α tem sido relacionada à maior expressão de CD86 enquanto que a expressão de CD80 é significativamente aumentada na presença de LPS, lipopolissacarídeo da bactéria *Escherichia coli* (Elkord et al., 2005). O LPS não foi utilizado para ativação de DCs nesse estudo por não ser, ao contrário do TNF- α , naturalmente detectado em humanos, o que poderia limitar a extrapolação da comparação de observações entre DCs na PCM *in vitro* e os eventos *in vivo* que ocorreriam nos pacientes.

Estudos prévios sobre a expressão de moléculas co-estimulatórias são inconclusivos. Alguns relacionaram a estimulação de CD86 à indução de resposta imune celular do tipo Th2 e de CD80 à Th1 (Kuchroo et al., 1995; Greenwald et al., 1999; Balkhi et al., 2004). Resultados conflitantes também foram observados em estudos na PCM. No modelo experimental da doença, Ferreira et al. (2004) observaram aumento na expressão de CD80 nas DCs estimuladas com gp43 e LPS, levando à redução da secreção de IL-12 e TNF- α . Adicionalmente, monócitos de pacientes com PCM ativa e tratada não apresentaram diferenças na expressão dessas moléculas (Bozzi et al., 2004; Cacere et al., 2008). Nos resultados do presente trabalho, foi observada alta expressão de CD86 nas DCs ativadas com TNF- α (DC+TNF) de pacientes com PCM tratada e indivíduos saudáveis. Sugere-se que as condições de cultivo dessas células sejam determinantes no fenótipo observado, ou seja, o uso de LPS favorece CD80, o uso de TNF- α age especialmente sobre CD86 e a expressão dessas duas moléculas não depende de um aumento pré-existente nos monócitos que originarão essas DCs.

Neves (2003) estudou as diferentes condições de cultura de DCs derivadas de monócitos humanos e observou que as diferentes concentrações das citocinas recombinantes utilizadas para a diferenciação e ativação de DCs são determinantes na modulação de moléculas co-estimulatórias. GM-CSF na concentração de 50 ng/mL, a mesma utilizada em nossos experimentos, foi capaz de aumentar o percentual de DCs CD86⁺ e a IMF de CD86 e CD80. IL-4, por sua vez, foi responsável pela diminuição de CD14 e aumentou a expressão de CD86, mas não de CD80. A ativação com TNF- α resultou no aumento do percentual de CD86 e tendência à diminuição da IMF de CD80. Discutiui-se então que a combinação dessas citocinas por si só seria capaz não só de diferenciar monócitos em DCs, como também aumentar CD86, sem modificar, porém, a expressão de CD80. Corroborando essas observações, nossos resultados também refletiram o aumento de CD86, não só do percentual, mas também da IMF, a falta de modificação em CD80 e, ainda, a mesma diminuição discreta dessa molécula com a adição de TNF- α .

Conhecida como a via de entrada do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) nas DCs (Geijtenbeek et al., 2000b), a molécula DC-SIGN vem atraindo cada vez mais a atenção pela descoberta de novas interações com diferentes patógenos e as respostas imunes conseqüentes. Sabe-se que a expressão dessa molécula é IL-4-dependente e que a sua regulação se dá pela presença de citocinas tanto anti- como pró-inflamatórias (Relloso et al., 2002). Nosso protocolo de diferenciação de monócitos em DCs utilizou IL-4 que, de fato, favoreceu a expressão de DC-SIGN (Figura 8), além disso, observou-se que a adição de TNF- α às culturas de DCs não-tratadas (nDC) de pacientes com PCM ou de indivíduos saudáveis para a ativação dessas células induziu discreta diminuição na IMF dessa molécula, assim como descrito

anteriormente por Puig-Kröger et al. (2004). Quando não-tratadas, as DCs de pacientes com PCM tratada apresentaram maior expressão dessa molécula quando comparadas aos grupos de pacientes com a doença ativa e o de indivíduos saudáveis. Essa observação pode estar relacionada à melhor diferenciação dos monócitos em DCs após a cura clínica, uma vez que DC-SIGN é altamente expresso nessas células e menos observado em outros tipos celulares.

Assim como as diferentes condições de cultivo de monócitos para a diferenciação de DCs podem modular a expressão de moléculas de superfície, é possível que também ocorram modificações na produção de citocinas. Testando essa hipótese, Roy et al. (2004) investigaram os efeitos de IL-4 sobre monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis. Houve diferenciação em DCs com características fenotípicas semelhantes às DCs mielóides clássicas (diferenciadas com IL-4+GM-CSF), com exceção à expressão de CD1a que foi muito menor. Essas DCs CD1a^{low}, quando estimuladas com IFN- γ e LPS, secretaram altos níveis de IL-10, semelhantes aos de DCs mielóides clássicas e maiores que os secretados por monócitos. Em nossos resultados (Figura 9) as nDC na PCM ativa secretaram significativamente menos IL-10 que nDC de indivíduos saudáveis. Se considerarmos que a secreção dessa citocina seja controlada por IL-4, GM-CSF e as diferentes substâncias utilizadas para ativação, pode-se sugerir que durante a doença ativa, os monócitos sofrem diferentemente os efeitos de IL-4, resultando na perda da secreção endógena de IL-10 descrita previamente nessas células de pacientes (Peraçoli et al., 2003; Parise-Fontes et al., 2006). O papel e a produção da IL-4 na PCM humana já foi largamente estudado em linfócitos e no conjunto de células mononucleares de sangue periférico devido à evidente relação dessa citocina à forma clínica mais grave

da doença, a forma juvenil (Oliveira et al., 2002; Mamoni e Blotta, 2005; Mamoni e Blotta, 2006), mas, no nosso conhecimento, não há relatos na literatura que relacionem a capacidade de absorção ou metabolização de IL-4 por monócitos isolados aos efeitos *in vivo* ou *in vitro* durante a PCM ativa.

A hipótese formulada sobre os diferentes efeitos de IL-4 sobre monócitos de pacientes com PCM ativa também poderia ser aplicada aos efeitos de GM-CSF nessas células. Ganguly et al. (2007) aplicaram GM-CSF em monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e obtiveram DCs chamadas intermediárias CD14^{low} e DC-SIGN⁺ que, quando estimuladas com TNF- α , IFN- γ e anticorpo anti-CD40, produziram altos níveis de IL-10 e baixos de IL-12.

A combinação de IL-4 e GM-CSF, e ativação apenas com TNF- α , em nossos experimentos, resultaram em um efeito modulatório negativo sobre IL-10, diferentemente de LPS sobre monócitos de pacientes com PCM ativa que levou ao aumento não só em relação às células não-estimuladas como em relação às células de indivíduos saudáveis (Peraçoli et al., 2003). Este efeito modulatório negativo de TNF- α sobre a secreção de IL-10 por células DC+TNF foi observado em todos os grupos estudados doença ativa, pacientes tratados e controles.

As DCs de pacientes com PCM tratada não apresentaram diferenças nas dosagens de IL-10 em relação às células de indivíduos saudáveis e de pacientes com a doença ativa. A ausência de diferenças entre os níveis dessa citocina secretada pelas células de pacientes com PCM ativa, e curada e tratada, foi também observada por Sadahiro et al. (2007b) e Oliveira et al. (2002). Aparentemente, o efeito modulatório da IL-10 tem início durante a doença, controlando o número de células que sofrem apoptose (Cacere et al., 2002), podendo persistir mesmo após a cura clínica, em

função de um equilíbrio estabelecido entre esta citocina e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α .

A IL-12 tem papel crucial na definição da resposta Th1, favorável na PCM, sendo responsável pela indução da produção de IFN- γ por células T e NK (Furgier-Vivier et al., 1997). Essa citocina é um heterodímero composto de duas proteínas, p40 e p35. A subunidade p40 pode se associar a outra cadeia, a p19, para formar uma nova citocina, a IL-23 que, diferentemente da IL-12, estimula um subgrupo de células T a produzirem IL-17 e não IFN- γ (Langrish et al., 2004). Dessa maneira, além de observarmos os efeitos de IL-4, GM-CSF e TNF- α sobre o fenótipo e a secreção de IL-10 por DCs, estudamos também os níveis de IL-12p40 que, em nossos experimentos, parecem estar diretamente relacionados à ativação bem sucedida das DCs (Figura 10). A adição de TNF- α às culturas de DCs induziu o aumento significativo de IL-12p40 similarmente ao efeito observado na expressão de CD86, em todos os grupos estudados.

A subunidade p40 da citocina IL-12 foi recentemente relacionada à resistência na PCM experimental. Após a infecção com *P. brasiliensis* em camundongos p40-deficientes, foram observados granulomas mal-formados e grandes quantidades de leveduras, sendo que todos os animais morreram até o 30º dia (Livonesi et al., 2008). Interessantemente, as DC+TNF de pacientes com PCM tratada secretaram doses mais elevadas dessa citocina comparativamente às células na doença ativa e, ainda que sem diferença estatística, também maiores que as observadas em células de indivíduos sadios. Sugere-se que a deficiência na produção de IL-12p40 pelas células de pacientes possa ser transitória na fase ativa da doença e atinja níveis próximos ou

mesmo maiores que os observados em células de indivíduos sadios após o tratamento.

Kleinschek et al. (2006), em um modelo experimental de infecção por *Cryptococcus neoformans*, observaram que camundongos IL-23-deficientes, como os animais IL-12-deficientes, apresentaram granulomas mal-formados e maior susceptibilidade à doença associada ao perfil Th2 de resposta imune. Os autores ressaltaram, porém, que a IL-23 isoladamente não tem papel tão protetor quanto a IL-12. Se considerarmos que ao dosar os níveis de IL-12p40, estamos também identificando possíveis níveis de IL-23, e que a combinação da produção endógena dessas duas citocinas poderia estar diretamente relacionada à proteção anti-fúngica, os elevados níveis observados nos sobrenadantes de DCs de pacientes com PCM tratada podem ser, em parte, associados à capacidade de cura clínica nessa doença. A IL-23, por outro lado, merece novos estudos para maiores esclarecimentos sobre o seu papel na PCM.

Em relação a outras citocinas inflamatórias, as concentrações da citocina IL-1 β , em nosso estudo, foram muito baixas para serem detectadas pelos kits de ELISA utilizados (dados não mostrados). Essa citocina é capaz de induzir a maturação dessas células e conseqüente aumento na secreção de IL-12 *in vitro* (Nakahara et al., 2005), porém, a baixa produção combinada aos altos níveis de IL-12p40 observados neste trabalho sugerem que este efeito não é autócrino e deva ocorrer pela adição de IL-1 β à cultura.

Vulcano et al. (2003) relacionaram a quimiocina CCL18 à quimiotaxia de DCs e linfócitos T e B naïve, sendo secretada abundantemente por DCs mielóides não-tratadas, na presença de IL-10, e inibida durante a maturação por TNF- α ou *Candida*

albicans. Observou-se, em nosso trabalho (Figura 11), sem que haja estudos similares na paracoccidiodomicose, que a secreção da quimiocina foi elevada em pacientes com PCM ativa e nos indivíduos saudáveis, e significativamente reduzida na doença curada e tratada, sendo que a presença de TNF- α não diminuiu os níveis de CCL18. Van Lieshout et al. (2006) também observaram que TNF- α e outros estímulos pró-inflamatórios não alteram a secreção da quimiocina por DCs, e que apenas IL-10 em altas concentrações pode estimular essas células a aumentar a produção de CCL18. Isso, em partes, pode explicar os níveis semelhantes entre culturas de nDC e DC+TNF, e a produção observada nas células de indivíduos saudáveis. As DCs de pacientes com a doença ativa, por sua vez, parecem possuir maior capacidade de produção de CCL18 que as células de pacientes tratados e, conseqüentemente, de atrair células naïve. Novos estudos se fazem necessários para esclarecer os efeitos secundários dessa quimiocina na resposta celular efetora na PCM.

Nos resultados de DCs na PCM tratada, observamos que havia melhor maturação e ativação das células desses pacientes, com maior expressão das moléculas HLA-DR, CD86 e DC-SIGN, e melhor capacidade inflamatória, com maior secreção de IL-12p40 e menor de IL-10. Tais resultados levantaram alguns questionamentos, sendo que o principal seria: por que as DCs, após a cura clínica da PCM, teriam essas características? Na tentativa de responder essa pergunta, levantamos duas hipóteses. Primeiro: devido ao protocolo utilizado de diferenciação de monócitos em DCs, cerca de 20% do total de células nas culturas seriam, em sua maioria, células de memória que influenciariam as DCs desses pacientes a apresentarem aquelas características. Ou segundo: os monócitos dos pacientes

tratados teriam adquirido maior capacidade de ativação por citocinas que os possibilitou se diferenciarem em DCs daquele fenótipo com o perfil de citocinas descrito.

Bozzi et al. (2007) estudaram os percentuais de populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ entre as células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM ativa e tratada e não observaram diferenças em relação aos valores de indivíduos saudáveis. Entretanto, a frequência de linfócitos T de memória foi cerca de duas vezes maior em pacientes com PCM que em indivíduos saudáveis, chegando a sete vezes mais quando as células foram estimuladas com antígenos de *P. brasiliensis*. Na população de linfócitos B, por outro lado, a frequência de células de memória só foi maior na presença do estímulo. Desse modo, é possível que em nossos experimentos, mesmo na ausência de um estímulo antigênico, linfócitos T de memória presentes nas culturas de pacientes com PCM tratada sejam capazes de modular os monócitos durante a diferenciação em DCs. Durante a doença ativa, esses linfócitos seriam anérgicos devido à presença do fungo e seus antígenos solúveis na circulação sanguínea (Benard et al., 1996), modulariam os monócitos de maneira diferente, resultando em DCs fenotipicamente semelhantes às células de indivíduos saudáveis e com baixa e alta produção de IL-10 e CCL18, respectivamente.

Para testar a hipótese de que linfócitos de memória poderiam interferir na expressão de moléculas de superfície e na secreção de citocinas por DCs, utilizamos os sobrenadantes de culturas de células de pacientes com PCM tratada para verificar a existência de um possível efeito de fatores solúveis sobre as células de indivíduos saudáveis. A outra hipótese considerando uma maior ativação dos monócitos de pacientes (imunidade inata/adquirida) foi testada por uso de métodos de separação de

monócitos que diminuísse consideravelmente o número de linfócitos nas culturas dos mesmos pacientes e indivíduos saudios (método magnético de micropérolas marcadas com anticorpo anti-CD14).

Quando comparamos os diferentes métodos de obtenção de DCs a partir de monócitos, verificamos menor IMF de CD11c nas nDC obtidas magneticamente em relação às obtidas por aderência (Figura 12). Considerando que a presença de linfócitos nas amostras de aDC, um aumento de expressão de CD11c poderia ser explicado pela interação entre essas populações celulares presentes nessas culturas. Dados similares foram anteriormente observados por Meunier *et al.* (1994) em células de Langerhans, tendo sido relacionado ao aumento da proliferação de linfócitos T. Nas DCs obtidas magneticamente, como não há esse contato com outro tipo celular, não se observou a mesma alteração na expressão da molécula.

Além da IMF de CD11c, o percentual de CD86 foi evidentemente diferente entre os dois tipos de obtenção de DCs testados e, como observado nos resultados das demais moléculas, houve diferença apenas entre as culturas de indivíduos saudios, mas não em relação às culturas de pacientes com PCM. Esta maior expressão de CD86 foi evidente para nDC ou DC+TNF quando os monócitos foram obtidos por aderência em relação a micropérolas e com DC+TNF quando monócitos obtidos tanto por aderência como por micropérolas foram comparados com os dados observados com nDC. Apesar de possível influência da presença de linfócitos em culturas obtidas por aderência, fica evidente um efeito da ativação por TNF- α independente da presença de linfócitos.

Em contraste com resultados descritos por Elkord *et al.* (2005) que também compararam os dois métodos de obtenção de DCs a partir de monócitos, na presença

ou não de TNF- α , e não verificaram diferenças na expressão da molécula, em nossos resultados, o percentual de células CD86⁺ foi significativamente menor em células obtidas com micropérolas em relação ao método de aderência. Além disso, o percentual também foi maior nas culturas ativadas com TNF- α . Tal discordância pode ser explicada pelos diferentes períodos de incubação utilizados para a ativação das DCs. No nosso protocolo, deixamos as DCs com ou sem TNF- α por 48 horas enquanto que naquele estudo, o período foi de 72 horas. Sugere-se que, num período maior de cultura, mais células passem a expressar a molécula independentemente da presença de TNF- α , uma vez que as DCs cultivadas em meio puro apresentaram percentuais de positividade muito semelhantes.

A maior expressão de moléculas de superfície HLA-DR e CD86 em nDC e DC +TNF e de DC-SIGN em nDC do grupo de pacientes do que de controles, registrada na primeira fase dos experimentos (Figuras 5 e 6), não foi observada na segunda etapa (Figuras 14 e 15). Esta diferença pode ser atribuída ao número de amostras analisadas em cada fase, tendo sido sensivelmente maior nos primeiros experimentos.

Em nossos resultados, as moléculas CD11c, CD1a e CD80 (Figuras 12, 13 e 16) tiveram expressões semelhantes às observadas na primeira etapa desse estudo (Figuras 3, 4 e 7), sem diferenças entre indivíduos sadios e pacientes com PCM.

Da mesma forma que o método de obtenção de DCs alterou a expressão de CD11c e CD86, houve diferenças na secreção de IL-10 e IL-12p40. Comparativamente aos resultados da Figura 9, manteve-se o padrão de maiores níveis de IL-10 nos sobrenadantes das células de indivíduos sadios em relação aos pacientes. Por outro lado, a diminuição da concentração dessa citocina observada

quando as células foram ativadas com TNF- α não foi reproduzida provavelmente devido ao menor número de indivíduos e pacientes incluídos nesta segunda etapa do experimento, com resultados muito heterogêneos. A presença de IL-10 em culturas de monócitos pode inibir a diferenciação para DCs e ainda prevenir a ativação dessas células (Corinti et al., 2001). Notou-se que os níveis de IL-10 foram um pouco mais elevados em culturas de DCs obtidas com micropérolas que, em partes, explica a menor expressão de CD86 por essas células.

Curiosamente, em nossos resultados, os sobrenadantes de culturas de pacientes parecem ter agido apenas nas DCs de indivíduos saudáveis obtidas por aderência, aumentando os níveis de IL-10 nas não-tratadas e diminuindo nas ativadas com TNF- α (Figura 18). É possível que haja outras citocinas não investigadas nesse trabalho que sejam secretadas apenas por células de pacientes e que agiriam sobre as células de indivíduos saudáveis no sentido de aumentar os níveis de IL-10 em culturas não-ativadas. O efeito inibitório de TNF- α observado na primeira etapa dos experimentos sobre a secreção dessa citocina, por outro lado, pode ter sido intensificado com o acréscimo dos sobrenadantes (Figura 9).

Nos resultados das dosagens de IL-12p40 (Figura 19), semelhante aos observados nos níveis de IL-10, também não houve reprodução dos resultados da primeira etapa dos experimentos, em que DCs de pacientes com PCM tratada produziram mais a citocina que as células de indivíduos saudáveis (Figura 10). As DCs de indivíduos saudáveis, obtidas por aderência e ativadas com TNF- α , secretaram significativamente mais IL-12p40 que as obtidas por micropérolas, cultivadas nas mesmas condições. Na mesma comparação, com células de pacientes, não foi observada diferença nos níveis da citocina entre os métodos de separação de

monócitos como também eles foram similares nas duas culturas. Esses dados corroboram com a possibilidade de que, na PCM, os monócitos sofram influências que resultem em maior capacidade de secreção dessa citocina, independente da presença de outras populações celulares na cultura. Adicionalmente, o encontro de maiores níveis de IL-12p40 quando sobrenadantes de células de pacientes obtidas por aderência foram adicionadas a culturas de células de indivíduos sadios obtidas com micropérolas e ativadas com TNF- α sugere a possível influência de fatores solúveis que seriam potenciados na presença de TNF- α . Os níveis de TNF- α não foram dosados nesses sobrenadantes por ter sido esta citocina recombinante utilizada no experimento de ativação de células dendríticas.

No presente trabalho não foram detectadas IL-12p70 e IFN- γ (dados não mostrados) nas culturas de células obtidas por aderência, sugerindo não terem contribuído para a ativação de DCs. Um dos principais mecanismos indutores da secreção de IL-12p70, considerada a subunidade bioativa da IL-12, é a forte ligação entre DCs e linfócitos T via CD40-CD40L, com conseqüente produção de IFN- γ (Abdi, 2002; Macagno et al., 2007). Desse modo, podemos assumir que, além dos linfócitos T estarem em número reduzido, não houve uma interação suficientemente forte entre eles e as DCs que resultasse na produção dessas duas citocinas. Adicionalmente, a ausência de IFN- γ descarta a possibilidade de que a ativação mais intensa observada em DCs de pacientes com PCM seja pela soma dos efeitos inflamatórios dessa citocina aos efeitos do TNF- α adicionado às culturas. No entanto, outras citocinas não dosadas neste trabalho, como IL-6, IL-8, IL-18, incluindo TNF- α (Kurokawa et al., 2007; Mamoni & Blotta, 2005; Panagio et al., 2008), que podem ser geradas por células de pacientes poderiam atuar sinergicamente. A influência

de linfócitos T de memória sobre a diferenciação de monócitos em DCs de pacientes com PCM merece estudos futuros mais profundos.

Finalmente, foram descritas pela primeira vez neste estudo características de DCs de pacientes com PCM tratada com maior capacidade de induzir *in vitro* uma resposta imune celular Th1, representada pela maior expressão de moléculas de superfície e de secreção de citocinas, abrindo-se novas áreas de investigações sobre o possível papel dessas células na inter-relação entre a imunidade inata e adaptativa na paracoccidioidomicose humana.

O presente trabalho expôs pela primeira vez a plasticidade *in vitro* de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com PCM e traz novos desafios aos conhecimentos de mecanismos de ativação dessas células por fatores do hospedeiro e antígenos fúngicos. Além disso, revela o potencial dessas células na geração de uma resposta imune protetora, abrindo perspectivas para possíveis intervenções na evolução da doença humana.

CONCLUSÕES



6. CONCLUSÕES

- Células dendríticas derivadas de monócitos do sangue periférico de pacientes com PCM podem ser diferenciadas e ativadas *in vitro* com TNF- α , expressando as moléculas de superfície características (CD11c, CD1a, HLA-DR, CD86 e DC-SIGN).
- Pacientes com PCM tratada exibiram células dendríticas com alta expressão das moléculas CD11c, CD1a, HLA-DR, CD86 e DC-SIGN, e pacientes com a doença ativa têm menor expressão dessas moléculas de superfície, em suas células dendríticas, similar às de indivíduos saudáveis (as diferenças foram estatisticamente significantes).
- Células dendríticas maduras e não-tratadas de pacientes tratados secretam mais IL-12p40 e menos CCL18 que pacientes com doença ativa, além de menor quantidade de IL-10 que indivíduos controle, sugerindo uma maior capacidade de gerar resposta tipo Th1.
- Células dendríticas de indivíduos saudáveis e pacientes tratados obtidas por aderência de monócitos resultaram em maior frequência de DCs CD86⁺ e em maior secreção de IL-12p40 que células obtidas por micropérolas, sugerindo a influência de linfócitos nas culturas de monócitos aderidos.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI K. IL-12: the role of p40 versus p75. *Scand J Immunol.* 2002; 56: 1-11.

ALMEIDA SR, MORAES JZ, CAMARGO ZP, GESZTESI J, MARIANO M, LOPES JD. Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol.* 1998; 190: 68-76.

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

BAGGIOLINI M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 1998; 392: 565-68.

BAIDA H, BISELLI P, JUVENALE M, DEL NEGRO G, MENDES-GIANINI MJS, DUARTE A, BENARD G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 1999; 1: 273-8.

BALKHI MY, LATCHUMANAN VK, SINGH B, SHARMA P, NATARAJAN K. Cross-regulation of CD86 by CD80 differentially regulates T helper responses from *Mycobacterium tuberculosis* secretory antigen-activated dendritic cell subsets. *J Leuk Bio.* 2004; 75: 874-83.

BANCHEREAU J, STEINMAN RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392: 245-52.

BARROZO LV, BENARD G, SILVA MES, BAGAGLI E, MARQUES SA, MENDES RP. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4: e643.

BENARD G, HONG M, DEL NEGRO GMB, BATISTA L, SHIKANAI-YASUDA MA, DUARTE AJS. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 54: 7-12.

BENARD G, ROMANO CC, CACERE CR, JUVENALE M, MENDES-GIANNINI MJS, DUARTE AJS. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2001; 13: 248-52.

BOZZA A, GAZIANO R, SPRECA A, BACCI A, MONTAGNOLI C, DI FRANCESCO P, ROMANI L. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol.* 2002; 168: 1362-71.

BOZZI A, REIS BS, PRADO FLS, PEDROSO EP, LEITE MF, GÓES AM. Modulation of CD28 and CD86 expression in patients with paracoccidioidomycosis in different periods of treatment. *Scand J Immunol.* 2004; 60: 500-5.

BOZZI A, REIS BS, GOULART MI, PEREIRA MCN, PEDROSO EP, GOES AM. Analysis of memory T cells in the human paracoccidioidomycosis before and during chemotherapy treatment. *Immunol Lett.* 2007; 114: 23-30.

BRUNA-ROMERO O, SCHMIEG J, DEL VAL M, BUSCHLE M, TSUJI M. The dendritic cell-specific chemokine, dendritic cell-derived CC Chemokine 1, enhances protective cell-mediated immunity to murine malaria. *J Immunol.* 2003; 170: 3195-203.

BUSTAMANTE-SIMON B, McEWEN JG, TABARES AM, ARANGO M, RESTREPO-MORENO A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* 1985; 23: 407-14.

CACERE CR, ROMANO CC, MENDES-GIANNINI MJS, DUARTE AJS, BENARD G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. *Clin Immunol.* 2002; 105: 215-22.

CACERE CR, MENDES-GIANNINI MJS, FONTES CJ, KONO A, DUARTE AJS, BENARD G. Altered expression of the costimulatory molecules CD80, CD86, CD152, PD-1 and ICOS on T-cells from paracoccidioidomycosis patients: lack of correlation with T-cell hyporesponsiveness. *Clin Immunol.* 2008; 129: 341-9.

CALICH VLG, KASHINO SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31: 615-23.

CALVI SA, PERACOLI MT, MENDES RP, MARCONDES-MACHADO J, FECCHIO D, MARQUES SA, SOARES AM. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect.* 2003; 5: 107-13.

CAVASSANI KA, CAMPANELLI AP, MOREIRA AP, VANCIM JO, VITALI LH, MAMEDE RC, MARTINEZ R, SILVA JS. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol.* 2006; 177: 5811-8.

CISALPINO PS, PUCCIA R, YAMAUCHI LM, CANO MIN, SILVEIRA JF, TRAVASSOS LR. Cloning, characterization and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem*. 1996; 271 :4553-60.

CORINTI S, ALBANESI C, LA SALA A, PASTORE S, GIROLOMONI G, Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol*. 2001; 166: 4312-8.

D'OSTIANI CF, DEL SERO G, BACCI A, MONTAGNOLI C, SPRECA A, MENCACCI A, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, ROMANI L. Dendritic cells discriminate between yeast and hyphae of the fungus *Candida albicans*: Implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med*. 2000; 191: 1661-73.

ELKORD E, WILLIAMS PE, KYNASTON H, ROWBOTTOM AW. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from *in vitro* generated dendritic cells. *Immunology*. 2005; 114: 204-12.

FERREIRA KS, LOPES JD, ALMEIDA SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Lett*. 2004; 94: 107-14.

FERREIRA KS, BASTOS KR, RUSSO M, ALMEIDA SR. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cell induces interleukin-10 production and Toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *J Infect Dis.* 2007; 196: 1108-15.

FURGIER-VIVIER I, SERVET-DUPRAT C, RIVAILLER P, RISSOAN M-C, LIU Y-J, RABOURDIN-COMBE C. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med.* 1997; 186: 813-23.

GAFA V, LANDE R, GAGLIARDI MC, SEVERA M, GIACOMINI E, REMOLI ME, NISINI R, RAMONI C, DI FRANCESCO P, ALDEBERT D, GRILLOT R, COCCIA EM. Human dendritic cells following *Aspergillus fumigatus* infection express the CCR7 receptor and a differential pattern of interleukin-12 (IL-12), IL-23, and IL-27 cytokines, which lead to a Th1 response. *Infect Immun.* 2006; 74: 1480-9.

GAFA V, REMOLI ME, GIACOMINI E, GAGLIARDI MC, LANDE R, SEVERA M, GRILLOT R, COCCIA EM. *In vitro* infection of human dendritic cells by *Aspergillus fumigatus* conidia triggers the secretion of chemokines for neutrophil and Th1 lymphocyte recruitment. *Microbes Infect.* 2007; 9: 971-80.

GAJEWSKI TF, PINNAS M, WONG T, FITCH FW. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J Immunol.* 1991; 146: 1750-8.

GANGULY D, PAUL K, BAGCHI J, RAKSHIT S, MANDAL L, BANDYOPADHYAY G, BANDYOPADHYAY S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor drives monocytes to CD14^{low}CD83⁺DC-SIGN⁻ interleukin-10-producing myeloid cells with differential effects on T-cell subsets. *Immunology.* 2007; 121: 499-507.

GEIJTENBEEK TBH, TORENSMA R, VAN VLIET SJ, DUIJNHOFEN GC, ADEMA GJ, VAN KOOYK Y, FIGDOR CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell.* 2000; 100: 575-85.

GEIJTENBEEK TB, KWON DS, TORENSMA R, VAN VLIET SJ, VAN DUIJNHOFEN GC, MIDDEL J, CORNELISSEN IL, NOTTET HS, KEWALRAMANI VN, LITTMAN DR, FIGDOR CG, VAN KOOYK Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* 2000; 100: 587-97.

GIMENEZ MF, TAUSK F, GIMENEZ MM, GIGLI I. Langerhans' cells in paracoccidioidomycosis. *Arch Dermatol.* 1987; 123: 479-81.

GODOY LC, MARIANO M, LOPES JD. Immunity and hypersensitivity to gp43 antigen in susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2003; 41: 427-36.

GREENWALD RJ, URBAN JF, EKKENS MJ, CHEN S, NGUYEN D, FANG H, FINKELMAN FD, SHARPE AH, GAUSE WC. B7-2 is required for the progression but not the initiation of the type 2 immune response to a gastrointestinal nematode parasite. *J Immunol.* 1999; 162: 4133-9.

HSIEH CS, HEIMBERGER AB, GOLD JS, O'GARRA A, MURPHY KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukin 4 and 10 in an alpha beta T cell receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1992; 89: 6065-9.

JUVENALE M, DEL NEGRO GM, DUARTE AJ, BENARD G. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. *J Med Microbiol.* 2001; 50: 127-34.

KALMAR EM, ALENCAR FE, ALVES FP, PANG LW, DEL NEGRO GM, CAMARGO ZP, SHIKANAI-YASUDA MA. Paracoccidioidomycosis: an epidemiologic survey in a pediatric population from the Brazilian amazon using skin tests. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71: 82-6.

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

KLEINSCHEK MA, MULLER U, BRODIE SJ, STENZEL W, KOHLER G, BLUMENSCHEN WM, STRUNBINGER RK, McCLANAHAN TM, KASTELEIN RA, ALBER G. IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J Immunol.* 2006; 176: 1098-106.

KUCHROO VK, DAS MP, BROWN JA, RANGER AM, ZAMVIL SS, SOBEL RA, WEINER HL, NABAVI N, GLIMCHER LH. B-7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 development pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell.* 1995; 80: 707-18.

KUROKAWA CS, ARAUJO JP Jr, SOARES AM, SUGIZAKI MF, PERAÇOLI MT. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiol. Immunol.* 2007; 51: 421-8.

LANGRISH CL, MCKENZIE BS, WILSON NJ, DE WAAL MR, KASTELEIN RA, CUA DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptative immunity. *Immunol Rev.* 2004; 202: 96-105.

LIMA SMD, DURLACHER RR. Situação da Paracoccidioidomicose em Rondônia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36 supl. 1: 30.

LIVONESI MC, SOUTO JT, CAMPANELLI AP, MAFFEI CML, MARTINEZ R, ROSSI MA, SILVA JS. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. *Med Mycol.* 2008; 46: 637-46.

LOPES JD, MOURA-CAMPOS MC, VICENTINI AP., GESZTESI JL, DE SOUZA W, CAMARGO ZP. Characterization of glycoprotein gp43, the major lamini-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz J Med Biol Res.* 1994; 27: 2309-13.

LUSTER AD. Chemokines: chemotatic cytokines that mediate inflammation. *New Engl J Med.* 1998; 12: 436-45.

MACAGNO A, NAPOLITANI G, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation.

Trends Immunol. 2007. 28: 227-33.

MAMONI RL, BLOTTA MHSL. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease.

Cytokine. 2005; 32: 20-9.

MAMONI RL, BLOTTA MHSL. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2006; 35: 207-16.

MAMONI R, NOUÉR SA, OLIVEIRA SA, MUSATTI CC, ROSSI CL, CAMARGO ZP, BLOTTA MHSL. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis.

Med Mycol. 2002; 40: 1-7.

MARQUES AS, SHIKANAI-YASUDA MA. Paracoccidioidomycosis associated with immunosuppression, AIDS and cancer. *In:* Franco M, Lacaz LC, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. ed. Paracoccidioidomycosis, Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994; 393-405.

MARQUES DA SILVA SH, QUEIROZ-TELLES F, COLOMBO AL, BLOTTA MHSL, LOPES JD, CAMARGO ZP. Monitoring gp43 antigenemia in paracoccidioidomycosis patients during therapy. *J Clin Microbiol.* 2004. 42: 2419-24.

MARTINEZ R, MOYA MJ. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. *Rev Saude Publica* 1992; 26: 12-16.

McEWEN JG, BEDOYA V, PATINO MM, SALAZAR ME, RESTREPO AM. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol.* 1987; 25: 165-75.

MENDES-GIANNINI MJS, BUENO JP, SHIKANAI-YASUDA MA, STOLF AMS, MASUDA A, NETO VA, FERREIRA AW. Antibody response to the 43kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 43: 200-6.

MEUNIER L, BOHJANEN K, VOORHEES JJ, COOPER KD. Retinoic Acid upregulates human Langerhans cell antigen presentation and surface expression HLA-DR and CD11c, a β 2 integrin critically involved in T-cell activation. *J Invest Dermatol.* 1994; 103: 775-9.

MOTA NGS, REZKALLAH-IWASSO MT, PERAÇOLI MT, AUDI RC, MENDES RP, MARCONDES J, MARQUES SA, DILLON NL, FRANCO MF. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79: 765-72.

MUSATTI CC, REZKALLAH MT, MENDES E, MENDES NF. *In vivo* and *in vitro* evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol.* 1976; 24: 365-78.

NAKAHARA T, URABE K, FUKUGAWA S, UCHI H, INABA K, FURUE M, MOROI Y. Engagement of human monocyte-derived dendritic cells into interleukin (IL)-12 producers by IL-1 β +interferon (IFN)- γ . *Clin Exp Immunol.* 2005; 139: 476-82.

NEVES AR. *Estudo da diferenciação in vitro de células dendríticas derivadas de monócitos sanguíneos: análise dos efeitos de diferentes condições de cultura no fenótipo imunoestimulador das células* [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2003.

NEWORAL EP, ALTEMANI A, MAMONI RL, NORONHA IL, BLOTTA MHSL. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2003; 21: 234-41.

OLIVEIRA SJ, MAMONI RL, MUSATTI CC, PAPAORDANOU PM, BLOTTA MHSL. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002; 4: 139-44.

PANAGIO LA, TRISTÃO FSM, MOREIRA AP, PEREIRA MSF, CAVASSANI KA, MILANEZI CM, ROSSI MA, SILVA JS. Role of interleukin(IL)-18 in experimental paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2008; 1-8.

PARISE-FONTES MR, MARQUES SA, SOARES AMVC, KUOKAWA CS, MARQUES MEA, PERAÇOLI MTS. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. *Br J Dermatol.* 2006; 154: 643-50.

PERAÇOLI MTS, KUOKAWA CS, CALVI SA, MENDES RP, PEREIRA PCM, MARQUES SA, SOARES AMVC. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 2003; 5: 413-8.

PFEIFFER C, MURRAY J, MADRI J, BETTOMLY K. Selective activation of Th1- and Th2-like cells *in vivo*-response to human collagen IV. *Immunol Rev.* 1991; 123: 65-84.

PIETRELLA D, CORBUCCI C, PERITO S, BISTONI G, VECCHIARELLI A. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. *Infect Immun.* 2005; 73: 820-7.

PIETRELLA D, BISTONI G, CORBUCCI C, PERITO S, VECCHIARELLI, A. *Candida albicans* mannoprotein influences the biological function of dendritic cells. *Cell Microbiol.* 2006; 8: 602-12.

PIETRELLA D, LUPO P, RACHINI A, SANDINI S, CIERVO A, PERITO S, BISTONI F, VECCHIARELLI AA. *Candida albicans* mannoprotein deprived of its mannan moiety is efficiently taken up and processed by human dendritic cell and induces T-cell activation without stimulating proinflammatory cytokine production. *Infect Immun.* 2008; 76: 4359-67.

PRADO M, SILVA MB, LAURENTI R, TRAVASSOS LR, TABORDA CP. Mortality due to systemic mycosis as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009. 104: 513-521.

PUCCIA R, TRAVASSOS LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 1610-5.

PUIG-KRÖGER A, SERRANO-GÓMEZ D, CAPARRÓS E, DOMÍNGUEZ-SOTO A, RELLOSO M, COLMENARES M, MARTÍNEZ-MUÑOZ L, LONGO N, SÁNCHEZ-SÁNCHEZ N, RINCON M, RIVAS L, SÁNCHEZ-MATEOS P, FERNÁNDEZ-RUIZ E, CORBÍ AL. Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and macrophages. *J Biol Chem.* 2004; 279: 25680-8.

RELLOSO M, PUIG-KRÖGER A, PELLO OM, RODRIGUEZ-FERNANDEZ JL, DE LA ROSA G, LONGO N, NAVARRO J, MUÑOZ-FERNANDEZ MA, SANCHEZ-MATEOS P, CORBÍ AL. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4-dependent and is negatively regulated by IFN, TGF- β , and anti-inflammatory agents. *J Immunol.* 2002; 168: 2634-43.

RICHARDS JO, AMPEL NM, LAKE DF. Reversal of coccidioidal anergy *in vitro* by dendritic cells from patients with disseminated coccidioidomycosis. *J Immunol.* 2002; 169: 2020-5.

RISSOAN MC, SOUMELIS V, KADOWAKI N, GROUARD G, BRIERE F, DE WAAL MALEFYT R, LIU YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 1999; 283: 1183-6.

ROMANI N, GRUNER S, BRANG D, KAMPGEN E, LENZ A, TROCKENBACHER B, FRITSCH PO, STEINMAN RM, SCHULER G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994; 180: 83-93.

ROY KC, BANDYOPADHYAY G, RAKSHIT S, RAY M, BANDYOPADHYAY S. IL-4 alone without the involvement of GM-CSF transforms human peripheral blood monocytes to a CD1a^{dim}, CD83⁺ myeloid dendritic cell subset. *J Cell Science.* 2004; 117: 3435-45.

SADAHIRO A, ROQUE ACM, SHIKANAI-YASUDA MA. Generic human leukocyte class II (DRB1 and DQB1) alleles in patients with paracoccidioicomycosis. *Med Mycol.* 2007; 45: 35-40.

SADAHIRO A, DIOGO CL, OSHIRO TM, SHIKANAI-YASUDA MA. Kinetics of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43 peptides in patients cured of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40: 156-62.

SALINA MA, SHIKANAI-YASUDA MA, MENDES RP, BARRAVIERA B, MENDES-GIANINI MJS. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *J Clin Microb.* 1998; 36: 1723-8.

SALLUSTO FA, LANZAVECCHIA A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1994; 179: 1109-18.

SARAIVA ECO, ALTEMANI A, FRANCO MF, UNTERKIRCHER CS, CAMARGO ZP. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin. *J Med Vet Mycol.* 1996; 34: 155-61.

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

SOUSA MGT, GHOSN EEB, NASCIMENTO RC, BOMFIM GF, NOAL V, SANTIAGO K, AZEVEDO CMPS, MARQUES SG, GONÇALVES AG, SANTOS DWCL, CRIADO PR, MARTINS JEC, ALMEIDA SR. Monocyte-derived dendritic cells from patients with severe forms of chromoblastomycosis induce CD4⁺ T cell activation *in vitro*. *Clin Exp Immunol.* 2009; 156: 117-25.

SOUTO, J. T.; ALIBERTI, J. C.; CAMPANELLI, A. P.; LIVONESI, M. C.; MAFFEI, C. M. L.; FERREIRA, B. R.; TRAVASSOS, L. R.; MARTINEZ, R.; ROSSI MA, SILVA JS. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- γ . *Am J Pathol.* 2003; 163: 583-90.

TABORDA CP, JULIANO MA, PUCCIA R, FRANCO M, TRAVASSOS LR. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun.* 1998; 66: 786-93.

THURNER B, RODER C, DIECKMANN D, HEUER M, KRUSE M, GLASER A, KEIKAVOUSSI P, KAMPGEN E, BENDER A, SCHULER G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods.* 1999; 223: 1-15.

TRAVASSOS LR. Immunochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. In: Franco M, Lacaz LC, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. ed. *Paracoccidioidomycosis, Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994; 67-86.*

UNANUE ER, ALLEN PM. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science.* 1987; 236: 551-7.

VAN LIESHOUT AWT, VAN DER VOORT R, LE BLANC LMP, ROELOFS MF, SCHREURS BW, VAN RIEL PLCM, ADEMA GJ, RADSTAKE TRDL. Novel insights in the regulation of CCL18 secretion by monocytes and dendritic cells via cytokines, Toll-like receptors and rheumatoid sinovial fluid. *BMC Immunol.* 2006; 7: 23-34.

VICENTINI AP, GESZTESI JL, FRANCO MF, DE SOUZA W, DE MORAES JZ, TRAVASSOS LR, LOPES JD. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 1994; 62: 1465-9.

VULCANO M, STRUYF S, SCAPINI P, CASSATELL M, BERNASCONI S, BONECCHI R, CALLERI A, PENNA G, ADORINI L, LUINI W, MANTOVANI A, VAN DAMME J, SOZZANI S. Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells. *J Immunol.* 2003; 170: 3843-9.

ANEXO



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
 RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Paracoccidiodomicose humana: reconhecimento de antígenos de *Paracoccidoides brasiliensis* por células dendríticas e linfócitos B de pacientes com diferentes formas clínicas

PESQUISADOR: Maria Aparecida Shikanai-Yasuda

CARGO/FUNÇÃO: professora titular INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 14500

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Investigação Médica

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO X RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

- 1. justificativa e os objetivos da pesquisa:** A Paracoccidiodomicose é uma doença que ocorre no Brasil, sendo causada por um fungo. As pesquisas sobre esta doença têm avançado, porém ainda é preciso esclarecer quais os fatores que levam ao desenvolvimento desta doença. Por este motivo este trabalho tem por objetivo examinar em um laboratório especializado de pesquisa, como alguns componentes existentes no sangue dos pacientes estão funcionando e de que forma isto pode influenciar no desenvolvimento da doença. Os resultados deste trabalho poderão contribuir para um melhor entendimento, contribuindo na busca da prevenção e tratamento desta doença.
- 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** Neste trabalho serão selecionados pacientes que serão examinados por um médico especialista em doenças infecciosas. Após a consulta médica serão coletados 100 mililitros (10 tubos) de sangue de cada paciente. Este material será imediatamente encaminhado ao Laboratório de Imunologia, onde será separado para os testes. Nestes testes, as células presentes no sangue serão avaliadas com relação à sua capacidade de reconhecer o fungo causador da doença e estimular o sistema imunológico.
- 3. desconfortos e riscos esperados:** O maior desconforto será no momento da coleta de sangue, porém este procedimento não trará nenhum risco à saúde do participante. Para a coleta serão utilizados somente materiais esterilizados e descartáveis.
- 4. benefícios que poderão ser obtidos:** Participando deste estudo, o voluntário não obterá qualquer benefício adicional, mas estará contribuindo enormemente para o avanço da pesquisa e na busca de um melhor entendimento desta doença.
- 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:** Não haverá procedimentos alternativos

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

- 1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.** O participante terá direito a esclarecer qualquer dúvida referente à sua participação neste estudo. Além disso, será notificado sobre qualquer nova informação relacionada a este trabalho, além de poder contatar qualquer membro da equipe deste projeto, cujo número de telefone é 3066-7047.
- 2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência:** A participação é voluntária, podendo o participante se retirar deste estudo a qualquer momento, se assim o desejar.
- 3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade:** A participação do voluntário neste trabalho será confidencial, sendo a identidade do participante mantida em sigilo. Os registros e resultados dos testes relacionados ao estudo serão informados somente aos médicos do HCFMUSP, bem como a autoridades normativas nacionais ou internacionais, com o objetivo de garantir informações de pesquisas clínicas ou para fins normativos.

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](#)