

**VANESSA GOMES BATISTA**

**EFEITO DE GLICOLIPÍDIOS DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*  
SOBRE A RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA DE INDIVÍDUOS  
SAUDÁVEIS CURADOS DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Gil Benard

Versão original

São Paulo  
2012

## RESUMO

BATISTA, V. G. **Efeito de glicolipídios de *Paracoccidioides brasiliensis* sobre a resposta imune inata e adaptativa de indivíduos saudáveis curados de paracoccidioidomicose.** 2012. 157 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Glicosíngolipídios (GSLs) são importantes componentes estruturais das membranas de células eucarióticas. Nos fungos, essas moléculas participam de processos como germinação de esporos, proliferação e alteração de morfologia. Quando adicionados a culturas de células, certos GSLs podem se inserir em regiões específicas das membranas celulares, os *lipid rafts*, e com isso modular a funcionalidade das células. *In vivo*, esses GSLs poderiam representar um mecanismo de escape em infecções por fungos, ou então desencadear ou potencializar uma resposta imune contra eles. Neste trabalho avaliamos se GSLs de *Paracoccidioides brasiliensis* possuem atividade imuno-moduladora em células de indivíduos saudáveis com ou sem histórico de paracoccidioidomicose (PCM). Foram testados glucosilceramida (CMH) e glicoinositolfosfoceramida (GIPC), extraídos de leveduras da cepa Pb-18. Os grupos experimentais consistiram de um grupo controle, contendo 20 indivíduos de ambos os sexos, sem histórico de PCM; e um grupo de indivíduos curados, ou seja, indivíduos saudáveis, mas que demonstraram susceptibilidade a PCM. No grupo controle, CMH elevou a linfoproliferação em culturas com fitohemaglutinina (PHA) de forma dose dependente, com efeito máximo na concentração de 50  $\mu$ M, porém sem efeitos em cultura com antígeno de *Candida albicans* (CMA) ou alteração do perfil de secreção de citocinas. Por outro lado, no grupo curado CMH não alterou linfoproliferação com PHA, porém apresentou um caráter inibitório em culturas com CMA e gp43, o componente imunodominante secretado por *P. brasiliensis*. Houve ainda uma queda na produção de citocinas de perfil Th1, IL-2 e IFN- $\gamma$ . Essa discrepância entre os grupos pode ter ocorrido devido à produção elevada de IL-10 por células apresentadoras de antígenos do grupo curado. CMH foi também capaz de elevar a expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 em monócitos, porém reduziu a capacidade de células dendríticas em induzir proliferação de linfócitos. No grupo curado, CMH reduziu a produção de IL-10 por células dendríticas maduras e aumentou a produção de IL-12p40, sugerindo um viés para indução de células Th1. GIPC apresentou efeitos distintos de CMH. A resposta

proliferativa de linfócitos não foi alterada por esse GSL, porém houve diferenciação favorável para células Th1 no grupo controle, fato que não ocorreu no grupo curado. GIPC ainda foi capaz de elevar a fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis*, exclusivamente no grupo controle, porém reduziu fortemente a maturação de células dendríticas e sua capacidade de induzir linfoproliferação. A funcionalidade de células iNKT de indivíduos controles e susceptíveis também foi avaliada neste trabalho. Para este estudo, foi incluído um terceiro grupo de indivíduos moradores de zona endêmica, com teste cutâneo para paracoccidina positivo. Não houve diferença no número de células, na capacidade de expansão e na produção das principais citocinas produzidas por essas células entre os grupos. Em conclusão, demonstramos que GSLs de *P. brasiliensis* são capazes de alterar a funcionalidade de diferentes células do sistema imune. Houve diferença na resposta a estes GSLs por indivíduos controles e susceptíveis, demonstrando a necessidade de se elucidar os mecanismos de ação dos GSLs e as alterações potencialmente associadas à susceptibilidade ou resistência à PCM.

**Palavras- chave:** Glicosfingolípídios. *Paracoccidioides brasiliensis*. Sistema imune.

## ABSTRACT

BATISTA, V.G. **Effects of *Paracoccidioides brasiliensis* extracted glycolipids on innate and adaptative immune response of healthy cured paracoccidioidomycosis patients.** 2012. 157 p. Ph.D. Thesis (Imunology) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Glycosphingolipids (GSL) are important structural compounds of membranes in eukaryote cells. In fungi, these molecules are involved in spores germination, growth and morphology change. When added in cellular culture, some GSL may insert into specific membrane regions, called lipid rafts. As result, they modulate cellular function. *In vivo*, GSLs could represent scape mechanisms from immune responses or, in the other hand, could trigger or improve host immune reaction. In this work we evaluated whether GSL extracted from *Paracoccidioides brasiliensis* are able to modulate immune cells of healthy cured paracoccidioidomycosis (PCM) patients or individuals who never had PCM. Two GSL, glucosylceramide (CMH) and glycoinositol-phosphoceramide (GIPC) were extracted from *P. brasiliensis* yeast cells. Two experimental groups were enrolled in this study: control group – composed of 20 healthy individuals of both sexes, who never had PCM; and cured group – composed of 15 healthy individuals who have had PCM in the past but are cured for over 10 years, whose represent susceptible individuals. In control group, CMH increased, in a dose-dependent manner, lymph-proliferation in cultures stimulated with phytohemagglutinin (PHA). Maximum effect was observed with 50  $\mu$ M. No modulation occurred when peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated with *Candida albicans* metabolic antigen (CMA). In cured groups, CMH had no effect on PHA-stimulated lymphocyte proliferation, however, CMH decreased gp43 and CMA- induced lymph - proliferative response. Also, there was a decreased in IL-2 and IFN- $\gamma$  production, which in turn may have occurred due to an increased IL-10 secretion by monocytes and dendritic cells observed in cured group. In both groups CMH increased CD80 and CD86 expression by monocytes. In the other hand, this GSL reduced lymphocyte proliferation response to co-cultured dendritic cells. CMH was able to reduce IL-10 and increase IL-12 p40 secretion by mature dendritic cells of cured group, suggesting a Th1 bias. The other GSL analyzed, GIPC, had no effects on lymphocyte proliferation, although it increased Th1 cytokines secretion. GIPC added to monocytes culture increased

phagocytic capacity, exclusively on control group. Maturation of dendritic cells, mostly of control group were diminished by this GSL, associated to a decrease in the dendritic cell capacity to induce lymph-proliferation. iNKT cells were also analyzed. A third experimental group, composed of five endemic areas living-individuals with no PCM history, was evaluated. There were no differences in iNKT cells number, expansion capacity and IL-10, IL-4 and IFN- $\gamma$  production among the three groups. In conclusion, GSL extracted from *P. brasiliensis* are able to modulate immune cells functions. Control and cured groups responded distinctly to CMH and GIPC in many assays. These results demonstrate the necessity of to clarify the GSL mechanisms of action and to understand the mechanisms conferring resistance or susceptibility to PCM.

**Keywords:** Glycosphingolipids. *Paracoccidioides brasiliensis*. Immune system.

## 1 INTRODUÇÃO

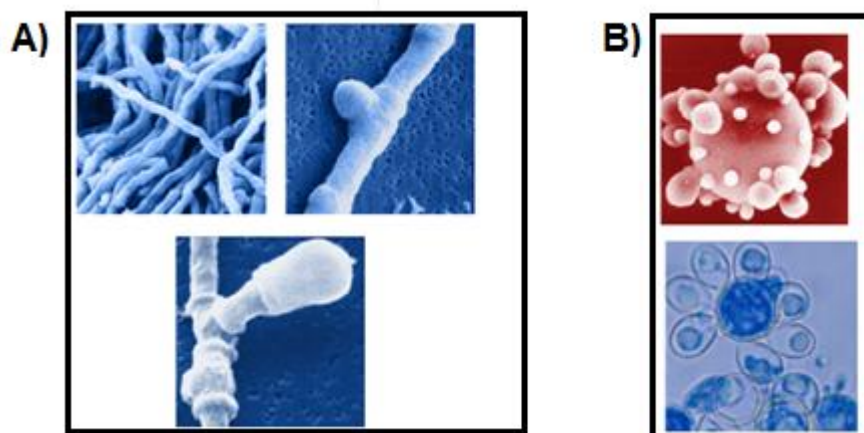
### 1.1 Paracoccidioidomicose

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Mesmo após 100 anos da sua descoberta, apresenta a maior taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas no Brasil, correspondendo a 44,6% das causas de morte entre essas micoses. Diferentemente de outras micoses como candidíase, criptococose ou aspergilose, que são associadas a pacientes imunodeprimidos, a PCM é rara nestes indivíduos e acomete principalmente indivíduos imunocompetentes (PRADO et al., 2009). Por não ser uma doença de notificação compulsória, não é possível afirmar com exatidão a incidência de novos casos, porém, estima-se que a taxa anual varie de 0,3 a 3 novos casos em cada 100.000 habitantes em áreas endêmicas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006) e não existem ainda medidas conhecidas para se evitar a infecção. No Brasil essas áreas endêmicas correspondem principalmente às regiões sudeste e centro-oeste e se estendem para países como Argentina, Colômbia e Venezuela (WANKE; AIDÊ, 2009), entre outros da América Latina.

A ecologia de *P. brasiliensis* ainda não está totalmente definida, mas várias evidências sugerem fortemente que seu habitat seja o solo (RESTREPO, 1985). Existe também certa conexão entre condições climáticas específicas e a prevalência da infecção. O desenvolvimento do fungo não é determinado diretamente pelo tipo de solo, arenoso ou argiloso. Entretanto solos argilosos possuem uma maior capacidade de reter água. A umidade, tanto do solo quanto do ar, é um fator determinante para o desenvolvimento do fungo (BARROZO et al., 2009; TERÇARIOLI et al., 2007). O aumento da umidade do ar pode facilitar a liberação de esporos do fungo, e no solo pode facilitar o crescimento de *P. brasiliensis*, que provavelmente habita abaixo da superfície, pois a detecção do fungo por biologia molecular ocorreu apenas em amostras coletadas de buracos deixados por tatus e não de solo coletado da superfície (TERÇARIOLI et al., 2007). O manuseio da terra por trabalhadores agrícolas e atividades correlatas exporia o fungo e possibilitaria a infecção, que ocorre pela inalação de esporos. A espécie de tatu *Dasypus novemcinctus* é o animal considerado

como um marcador de áreas de risco, por ser um animal que se desenvolve nas mesmas áreas consideradas endêmicas para o *P. brasiliensis* e por vários estudos terem mostrado a infecção pelo fungo nesses animais (FERNANDES et al., 2004; RICHINI-PEREIRA et al., 2008; SILVA-VERGARA; MARTINEZ, 1999). Entretanto, seu papel como reservatório natural do microorganismo não é comprovado. Recentemente vem sendo demonstrados casos de infecção pelo fungo em diversos outros animais selvagens ou aqueles cujo habitat é relacionado com o solo, como cães (ONO et al., 2001), cavalos (CORTE et al., 2005a), bovinos (SILVEIRA et al., 2005), macacos (CORTE et al., 2005b), cobaia, porco-espinho e guaxinins (RICHINI-PEREIRA et al., 2008) demonstrando que não só tatus, mas uma grande variedade de mamíferos pode ser infectada por *P. brasiliensis*.

*Paracoccidioides brasiliensis* pertence ao filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae. Possui a característica de ser termo-dimórfico, ou seja, sua morfologia varia de acordo com a temperatura. Quando à temperatura ambiente, o fungo encontra-se na forma de micélio, com hifas hialinas, finas e septadas (figura 1a). Nesta forma, a membrana celular é composta por 36 - 47% de glucanas, 7 - 18% de quitina (polímero de glucosamina), 24 - 41% de proteínas e 5 - 10% de lipídios (KANETSUNA et al., 1969). Entretanto, com a mudança de temperatura para 35 – 37 °C ocorrem mudanças na composição da membrana do fungo, alteração de sua rigidez e sua morfologia, para leveduriforme. Nesta fase, a composição da membrana passa para 36 - 47% de glucanas, 37- 48% de quitina, 7 - 14% de proteínas e 5 - 10% de lipídios (KANETSUNA et al., 1969). As leveduras apresentam múltiplos brotamentos característicos de *P. brasiliensis* (figura 1b), lembrando a forma de timão (LACAZ, 1994).

**Figura 1** - Morfologia de *P. brasiliensis*:

Morfologias possíveis de *P. brasiliensis*. A) Forma filamentosa do fungo, à temperatura ambiente; B) brotamentos na forma de levedura, a 37 °C.  
FONTE: Figura adaptada de Broad Institute (2012).

A infecção humana ocorre pela inalação dos propágulos (conídios) liberados de *P. brasiliensis* na sua fase miceliana (forma infectante), os quais invadem as vias aéreas, alvéolos e bronquíolos terminais, transformando-se em levedura (RESTREPO, 1985), sua forma patogênica. Indivíduos do sexo masculino são os mais afetados (1 mulher : 10-15 homens). Entretanto essa diferença de prevalência não existe em indivíduos com idade inferior a 14 anos, devido provavelmente a um efeito protetor do hormônio feminino estrogênio, o qual inibe a transformação do fungo da forma de conídio para levedura (ARISTIZABAL et al., 1998; LOOSE et al., 1983; SALAZAR, RESTREPO, STEVENS, 1988). Como a infecção normalmente atinge os indivíduos nas idades mais produtivas, a PCM acaba tendo um importante impacto social. O tratamento com drogas antifúngicas (geralmente itraconazol ou uma combinação de sulfametazol e trimetropim) é longo, em média de 6 meses a 2 anos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006) e podem ainda permanecer sequelas nos órgãos comprometidos, como má absorção intestinal, estenose de laringe, disfunção das glândulas adrenais, fibrose pulmonar e/ou epilepsia, entre outros (LONDERO, 1986).

As manifestações clínicas da doença podem ser uma forma aguda / sub-aguda (juvenil); ou crônica (adultos). A **doença aguda** corresponde a 3 - 5% dos casos em que há manifestações clínicas e ocorre principalmente em crianças, adolescentes e adultos com menos de 30 anos. Nestes casos, o fungo inalado se dissemina a partir dos pulmões através do sistema monocítico-fagocitário e se estabelece em gânglios linfáticos, fígado



e baço, causando esplenomegalias e crescimento de gânglios. Os sintomas podem incluir febre, manifestações cutâneas, perda de peso, dor abdominal, compressão de intestino ou ductos biliares, vômito, diarreia, entre outros. Nestes casos o envolvimento pulmonar é raro (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Por sua vez, a **doença crônica** é a de maior prevalência, correspondendo a mais de 90% dos casos de doença. Nestes casos o fungo permanece quiescente e após um longo período de tempo, anos ou décadas, ocorre reativação do foco inicial, progredindo para uma infecção de caráter granulomatoso ou fibrótico, que acomete pulmões e mucosas da via respiratória, oral, de faringe, laringe e pulmonar (FRANCO, 1987). Os sintomas geralmente são um histórico de tosse com duração de vários meses, perda de peso, anorexia devido à dificuldade em engolir os alimentos e em alguns casos, comprometimento das glândulas adrenais. Tais manifestações clínicas são condicionadas a fatores relacionados ao fungo (virulência, patogenicidade e composição antigênica) e ao hospedeiro (susceptibilidade genética, faixa etária, tabagismo, etilismo, desnutrição e deficiência do sistema imunológico) (LONDERO, 1982).

## 1.2 Resposta imune na paracoccidioidomicose

Grande parte dos fungos é capaz de alterar sua estrutura e metabolismo para sobreviver ao ambiente em que estão alocados. Essas alterações incluem modificações na composição de suas membranas, troca de morfologia e têm como finalidade adquirir nutrientes, estabelecer uma relação simbiótica, comensal, latente ou patogênica ou ainda, escapar de uma resposta imune desencadeada num hospedeiro (ROMANI, 2011). Mesmo com essa habilidade de se camuflar, o sistema imune é capaz de reconhecer a presença do patógeno e desencadear respostas imunes que impedem ou limitam o crescimento fúngico. Por outro lado, também é necessário que o dano tecidual causado pelas respostas imunes geradas seja minimizado. Assim, um balanço fino entre sinais anti e pró-inflamatórios é necessário para manter a relação fungo-hospedeiro e um desbalanço nessa relação pode acarretar consequências patológicas.

A primeira linha de defesa contra a infecção por *P. brasiliensis* ocorre nos pulmões, sítio de entrada do patógeno, por macrófagos alveolares (FRANCO, 1987, BRUMMER, 1994) e demais componentes da imunidade inata, tais como defensinas e

outras proteínas secretadas pelo epitélio pulmonar (CALICH et al., 2008). As células do sistema imune detectam a presença de um micro-organismo pela ligação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - do inglês: *pathogen associated molecular patterns*) (BARTON; MEDZITOV, 2002; GORDON, 2002) a diversos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês: *pattern recognition receptors*) presentes nas células do hospedeiro. Pela ativação de PRRs, macrófagos pulmonares reconhecem *P. brasiliensis*, levando à fagocitose e geração de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em modelo animal (BRUMMER et al., 1989; GONZALEZ et al., 2000; MOREIRA et al., 2008) e principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células humanas (CARMO et al., 2006), importantes para a lise do fungo. A fagocitose do fungo nem sempre é suficiente para o controle da infecção, uma vez que sem a ativação adequada e a geração de moléculas microbicidas suficientes, o fungo permanece viável no interior da célula hospedeira (BRUMMER et al., 1989, MOSCARDI-BACCHI; BRUMMER; STEVENS, 1994) e esta passa a ser um reservatório e disseminador da infecção para outros sítios. A complexidade da resposta imune contra *P. brasiliensis* é evidenciada pelo fato de que, paradoxalmente, macrófagos alveolares de modelos animais susceptíveis à PCM (camundongos B10.A) apresentam uma maior produção de NO e IL-12 e são mais competentes em controlar a infecção inicial do que animais resistentes (camundongos A/J), que produzem baixas concentrações desse metabólito e TGF- $\beta$  em maior concentração. Esse padrão parece ser revertido somente quando passa a haver a ação concomitante do sistema imune adaptativo, com secreção de IL-2 e IFN- $\gamma$ . Dessa forma os macrófagos pulmonares dos animais resistentes adquirem capacidade fungicida enquanto que as altas concentrações de NO produzidas pelos animais susceptíveis poderiam posteriormente atuar como inibidores da função de células T nesses animais (PINA; BERNARDINO; CALICH, 2008).

Os principais componentes encontrados nas membranas dos fungos são as  $\beta$ -glucanas, (polímeros de glucose ligados entre si por ligações do tipo  $\beta$ ); quitina (polímeros de N-acetilglucosamina) e mananas (cadeias de manose). Esses polissacarídeos estruturais da parede celular fúngica são altamente conservados entre os fungos e críticos para seu crescimento e desenvolvimento, sendo assim PAMPs ideais. Durante uma infecção fúngica, diversos PRRs podem ser ativados simultaneamente e a resposta imune final vai depender do grau de ativação relativo de cada receptor, do tipo celular, da espécie de fungo, de seus componentes estruturais, rota de infecção e a

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

