

ALINE FLORÊNCIO TEIXEIRA

**Avaliação terapêutica da formulação vacinal baseada
no peptídeo P10 derivado da glicoproteína (gp43)
de *Paracoccidiodes brasiliensis* e na
flagelina de *Salmonella* (FliCd)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

ALINE FLORÊNCIO TEIXEIRA

**Avaliação terapêutica da formulação vacinal baseada
no peptídeo P10 derivado da glicoproteína (gp43)
de *Paracoccidiodes brasiliensis* e na
flagelina de *Salmonella* (FliCd)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão Original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Teixeira, Aline Florêncio.

Avaliação terapêutica da formulação vacinal baseada no peptídeo P10 derivado da glicoproteína (gp43) de *Paracoccidioides brasiliensis* e na flagelina de *Salmonella* (FliCd) / Aline Florêncio Teixeira. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Luis Carlos de Souza Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Vacinas.

Versão do título para o inglês: Therapeutic evaluation of the vaccinal formulation based on P10 peptide from glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Salmonella* flagelin (FliCd).

Descritores: 1. Vacinas 2. Adjuvantes 3. Micose sistêmica 4. Antifúngicos 5. Imunoterapia 6. Imunologia celular I. Ferreira, Luis Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB099/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline Florêncio Teixeira.

Título da Dissertação: Avaliação terapêutica da formulação vacinal baseada no peptídeo P10 derivado da glicoproteína (gp43) de *Paracoccidioides brasiliensis* e na flagelina de *Salmonella* (FliC_d).

Orientador(a): Luis Carlos de Souza Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n° **107** nas fls. **74** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Luis Carlos de Souza Ferreira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Avaliação terapêutica da formulação vacinal flagelina de Salmonella (FliCd) e o peptídeo derivado da glicoproteína (gp 43) de Paracoccidioides brasiliensis (peptídeo P10)** do qual participou(aram) o(s) alunos **Aline Florêncio Teixeira, Catarina Joelma Magalhães Braga, Julián Esteban Munóz Henao, Carolina Salcedo Rivillas e os pesquisadores Carlos Pelleschi Taborda, Maria Elisabete Sbrogio de Almeida**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **25.08.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 26 de agosto de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

*Ao Professor Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, por ser exemplo de dedicação e ética na pesquisa, e por me oferecer essa oportunidade tendo toda paciência em me orientar e ensinar.
Meus sinceros agradecimentos a você.*

*À família que me foi concedida nessa vida. Francisco meu pai,
Azinete minha mãe Andréia e Ana Paula minhas irmãs.
Agradeço por todo apoio e amor incondicional.*

Ao meu amor Fernando por toda paciência e compreensão durante o desenvolvimento desse trabalho e pela confiança depositada.

À Catarina Joelma Magalhães Braga, por me receber no laboratório como sua estagiária, e transmitir parte de seu conhecimento.

À Dra Maria Elízabete Sbrogio de Almeida pelo simples fato de existir. Pois com toda calma e paciência compartilha seus conhecimentos como ninguém.

À Dra Rita de Cássia Café, por sempre ajudar a todos sem distinção. E por sempre se preocupar com a organização do laboratório.

Ao Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda, por compartilhar parte do seu trabalho conosco, disponibilizando os materiais necessários para o desenvolvimento desse trabalho. E também pelas sugestões oferecidas.

*Ao Julian Esteban, por sua enorme vontade de sempre ajudar. Pela paciência e ensinamentos nos momentos de dúvidas sobre *P. brasiliensis*. Peço até desculpas por tanto que o perturbei. Mas enfim, meu muito obrigado.*

À Loren Cristina da Silva, por ser uma pessoa especial e me receber tão bem no laboratório, por compartilhar as horas de almoço comigo e sempre estar disposta a me ouvir nos momentos de desabafo. Com certeza posso dizer que encontrei uma grande amiga.

À amiga Daniela da Luz, por compartilhar vários momentos especiais, pelas intensas conversas e por ser tão alegre e sincera. Eu sei que posso contar com você sempre Amiga!

À Carolina Salcedo Rivillas, minha amiga, minha companheira de quarto, eu só tenho a te agradecer por sempre me escutar, discutir questões do nosso trabalho, discutir os problemas da vida, por ser uma verdadeira amiga. Meus sinceros agradecimentos a você. Graças a Deus você cruzou o meu caminho.

À Priscila Aparecida Dal Pozo Gomes, pelas conversas engraçadas, desabafo profissional e familiares, por me oferecer uma cama para dormir quando precisei. Enfim obrigada por tudo, por proporcionar vários momentos de descontração.

Ao Roberto Nepomuceno por ser um grande amigo, por sempre ajudar tirando minhas dúvidas sobre microbiologia, por estar sempre disposto a me ouvir e por compartilhar vários momentos.

À Karine Guimarães, por ser uma pessoa tão dócil e agradável de conviver. Por tirar várias dúvidas sobre reforma de casa, casamento em geral. E por ter me proporcionado conhecer a Tica.

À Debora Santos, por ser sempre simpática e sincera.

Ao Francisco Cariri, por estar sempre disposto a ajudar com muita vontade e dedicação sem medir esforços para tal, pelos momentos de descontração no cafezinho e pelas caronas até o metrô. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Rafael Ciro, pessoa brilhante que me ensinou muito durante esses anos de forma paciente e com muito respeito. Obrigada por nos descontrair com o seu jeito alegre.

Ao Jaime Henrique, por sempre ajudar e aconselhar profissionalmente.

Ao Eduardo Gimenez, por ser bem profissional e divertido.

À Renata Damásio, Denicar Lina, Bruna Maldonato Porchia, Mariana Diniz, Raíza Bezerra, Rogério Lourenço por serem pessoas tão éticas e dedicadas aos seus trabalhos.

À Vanessa Kummer, amiga que conheci na primeira disciplina realizada e me acompanhou durante todo esse período em várias disciplinas e no PAE.

À Elíne, pela amizade e pelas conversas no corredor antes de entrar para o biotério. E agradeço por tudo.

À Juliana Afonso, Sandra Regina e ao Luís do biotério de Parasitologia do ICB, por serem tão dedicados aos seus trabalhos e cuidarem zelosamente dos animais.

Aos secretários do Departamento de Microbiologia e da Pós-Graduação, Alice Shimabuku, Bruno, Ana Maria Amaral e Naide Farripas, por sempre ajudarem.

Aos seguranças do ICB II, por serem sempre simpáticos e ajudarem quando preciso.

Aos funcionários do serviço de Biblioteca do ICB, por trabalharem de forma eficiente, por serem sempre gentis informando o necessário.

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP, pelo auxílio à pesquisa, possibilitando a realização desse trabalho.

*Agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indireta
para realização desse trabalho.*

*E por fim, agradeço acima de tudo a Deus, que iluminou o meu
caminho em mais uma etapa da minha vida. Sem ele tudo teria
sido ainda mais difícil!*

*Tudo vale a pena quando a alma
não é pequena!*

Fernando Pessoa

RESUMO

TEIXEIRA, A. F. **Avaliação terapêutica da formulação vacinal baseada no peptídeo P10 derivado da glicoproteína (gp43) de *Paracoccidioides brasiliensis* e na flagelina de *Salmonella* (FliCd).** 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Aproximadamente 10 milhões de pessoas que vivem em áreas endêmicas estão infectadas com *P. brasiliensis* e até 2% destas podem desenvolver a PCM. Períodos extensos de quimioterapia são necessários para tratar a PCM e problemas de recidiva da doença são frequentes. Vacinas anti-PCM ainda não estão disponíveis para uso em humanos, porém, nos últimos anos, testes em modelo animal mostram que estratégias vacinais são viáveis. Formulações vacinais baseadas na proteína de parede celular (gp43) e de um peptídeo, denominado P10, específico para células T CD4⁺ mostram-se promissores como antígenos vacinais. Em trabalho anterior foi demonstrado que a combinação do peptídeo P10 com uma flagelina de *Salmonella* foi capaz de conferir excelentes níveis de proteção profilática a desafios com *P. brasiliensis*. No presente trabalho, testamos as propriedades de uma formulação vacinal terapêutica baseada no peptídeo P10 combinado com flagelina FliCd de *Salmonella enterica*, associada ou não à quimioterapia, como tratamento da PCM experimental. Para isso animais Balb/c foram infectados com uma linhagem virulenta de *P. brasiliensis* (Pb18) e tratados por 30 dias após o desafio com três ou quatro doses da formulação vacinal, administrada por via i.n. ou s.c., combinada ou não ao tratamento com quimioterápicos (sulfametoxazol/trimetropim). Os resultados indicaram que animais tratados apenas com a vacina, combinada ou não com os quimioterápicos, não demonstraram uma redução significativa da carga fúngica no pulmão quando comparados com os animais infectados e não tratados. No entanto granulomas mais organizados foram observados no pulmão dos animais que receberam a formulação vacinal. A análise do perfil de citocinas secretadas por células do pulmão, em animais imunizados, não revelou uma modulação no padrão de resposta imune nos animais submetidos ao regime vacinal. Os resultados indicam que, ao contrário do observado em condições profiláticas, a formulação vacinal P10 e FliCd, não apresentou efeito terapêutico significativo frente à PCM previamente estabelecida nos animais.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Vacinas. Peptídeo P10. Flagelina. *Salmonella*. Adjuvantes.

ABSTRACT

TEIXEIRA, A. F. **Therapeutic evaluation of the vaccinal formulation based the P10 peptide from glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Salmonella* flagelin (FliC*d*)**. 2011. 86 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Approximately 10 million people living in endemic areas may be infected with this fungus and up to 2% of them may develop the disease. Extended periods of chemotherapy are often necessary to treat PCM and relapses occur frequently. PCM vaccines are not yet available for use in humans, but in recent years tests in animal models showed that vaccine strategies are viable. Vaccine formulations based in secreted cell wall protein (gp43) and a derived peptide (P10), representing a CD4⁺ T cell-specific epitope, have showed promising results as vaccine antigens. In a recent work, it was show that the P10 peptide combined with a *Salmonella* flagellin resulted in excellent protective levels to challenges with *P. brasiliensis*. In the present work, we tested the properties of a vaccine formulation based on the P10 peptide admixed with the *Salmonella enterica* FliC*d* flagellin, in combination or not with chemotherapy, as a PCM therapeutic treatment. Balb/c mice were infected with a highly virulent *P. brasiliensis* (Pb18) strain and treated for 30 days after challenge with three or four doses of the vaccine formulations, administered i.n or s.c., combined or not with an antifungal drug treatment (Trimethoprim/Sulfamethoxazole). Treated mice, combined or not with chemotherapy, showed no significant reduction in lung fungal burden when compared to non-treated animals. Nonetheless, more organized lung granulomas were observed in animals that received the vaccine formulation. Analysis of cytokines secreted by lung cells of immunized mice did not show a shift in the immune response pattern induced by the different therapeutic vaccine regimen. The data suggest that, unlike the vaccine tested under prophylactic conditions, the P10 and FliC*d*-based vaccine, did not induce significant therapeutic protection to experimental PCM.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Vaccine. P10 peptide. Flagellin. *Salmonella*. Adjuvants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Extração de flagelina FliCd nativa de <i>S. Muenchen</i>	42
Figura 2 - Atividade biológica <i>in vitro</i> da flagelina FliCd.....	43
Figura 3 - A flagelina FliCd recombinante é capaz de ativar a produção de IL-6 <i>in viv</i> ..	44
Figura 4 - Regime vacinal empregado para avaliar o efeito terapêutico da formulação vacinal P10 e flagelina.....	45
Figura 5 - Efeito terapêutico sobre a infecção com a linhagem Pb18 em camundongos BALB/c imunizados com formulações vacinais constituídas por diferentes concentrações do peptídeo P10 e FliCd.....	46
Figura 6 - Produção de citocinas em animais submetidos ao tratamento vacinal terapêutico contra a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	48
Figura 7 - Produção de citocinas em animais submetidos ao tratamento vacinal terapêutico contra a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	49
Figura 8 - Histopatologia representativa de lesões no tecido pulmonar de animais submetidos aos tratamentos vacinais terapêuticos contra a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	50
Figura 9 - Efeito do número de doses da formulação vacinal baseada no peptídeo P10 e FliCd sobre a infecção com a linhagem Pb18 de <i>P. brasiliensis</i>	51
Figura 10 - Produção de citocinas em tecido pulmonar de animais submetidos ao tratamento vacinal terapêutico contendo diferentes números de doses.....	53
Figura 11 - Regime vacinal empregado para avaliar o efeito terapêutico da formulação P10 e FliCd flagelina administrada pelas vias s.c. ou i.n.....	56
Figura 12 - Efeito da via de administração da vacina baseada no peptídeo P10 e flagelina FliCd sobre a infecção com <i>P. brasiliensis</i>	57
Figura 13 - Produção de citocinas em animais submetidos ao tratamento vacinal de quatro doses administrado pelas vias i.n. ou s.c.....	58
Figura 14 - Histopatologia representativa de lesões no tecido pulmonar de animais submetidos ao tratamento vacinal de quatro doses administradas pelas vias i.n. ou s.c. após infecção por <i>P. brasiliensis</i>	60
Figura 15 - Efeito da combinação do tratamento vacinal administrado por via i.n com o tratamento quimioterápico na infecção experimental com Pb.....	62
Figura 16 - Efeito da combinação do tratamento vacinal administrado por via s.c com o tratamento quimioterápico na infecção experimental com Pb.....	64

- Figura 17 - Produção de citocinas em animais submetidos ao tratamento vacinal terapêutico em associação com a quimioterapia específica para Pb.....66**
- Figura 18 - Histopatologia representativa de lesões no tecido pulmonar de animais submetidos ao tratamento vacinal combinado à quimioterapia.....68**

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1 - Linhagens bacterianas utilizadas.33

Tabela 2 - Linhagens celulares utilizadas.....34

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	-	Células apresentadoras de antígeno
BHI	-	Infusão de cérebro e coração
CD	-	Células dendríticas
COX-2	-	ciclooxigenase 2
CFA	-	Adjuvante Completo de Freund
CMV	-	Citomegalovírus
DMEM	-	Meio Dulbecco modificado
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra acético
ELISA	-	Ensaio imunossorbente ligado à enzima
EU	-	Unidade endotóxica
FliC _d	-	flagelina tipo d
FliC _i	-	flagelina tipo i
FliC _B	-	flagelina tipo B
GM-CSF	-	Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
GMP	-	Boas práticas de fabricação
gp43	-	Glicoproteína de 43kDa
HDT	-	Hipersensibilidade do tipo tardio
HLA	-	Antígeno leucocitário humano
ICAM	-	Molécula de adesão intercelular
IFA	-	Adjuvante incompleto de Freund
IFN- γ	-	Interferon gama
IgG 1	-	Imunoglobulina G 1
IL-1	-	Interleucina 1
IL-2	-	Interleucina 2
IL-4	-	Interleucina 4
IL-6	-	Interleucina 6
IL-8	-	Interleucina 8

IL-10	-	Interleucina 10
IL-12	-	Interleucina 12
i.m	-	intramuscular
i.n	-	intranasal
iNOS	-	Óxido nítrico sintase induzível
i.t	-	intratraqueal
kDA	-	Quilodalton
LAL	-	Lisado de Amebócitos de Limulus
LB	-	Luria Bertani
LPS	-	Lipopolissacarídeo
LT α	-	Leucotrieno alfa
LT β	-	Leucotrieno beta
MAPs	-	Múltiplos peptídeos antigênicos
MHC II-		Complexo principal de histocompatibilidade II
MyD88-		Fator diferenciação mielóide
NF- κ B	-	Fator Nuclear – kapa B
NK	-	<i>Natural killer</i>
ON	-	Óxido nítrico
OVA	-	Ovalbumina
P10	-	Peptídeo P10
Pb	-	<i>Paracoccidiodes brasiliensis</i>
PBS-T	-	Tampão salina fosfato mais 0,5% de tween 20
PSA	-	Persulfato de amônia
PCM	-	Paracoccidioidomicose
PLGA	-	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
q.s.p	-	quantidade suficiente para
s.c	-	subcutânea
SDS-PAGE-		Duodecil sulfato de sódio eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	-	Soro fetal bovino

Sulfa/Tri-	Sulfametoxazol/trimetropim
Th1 -	Linfócito T auxiliar 1
Th2 -	Linfócito T auxiliar 2
Th17 -	Linfócito T auxiliar 17
TLR -	Receptor do tipo Toll
TGF- β -	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- α -	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFC -	Unidade formadora de colônia
VCAM-	Molécula de adesão de célula vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	OBJETIVOS.....	32
	2.1 Objetivo geral.....	32
	2.2 Objetivos específicos.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
	3.1 Linhagens e plasmídeos	33
	3.1.1 <i>Linhagens bacterianas</i>	33
	3.1.2 <i>Linhagens celulares</i>	33
	3.1.3 <i>Plasmídeos</i>	34
	3.1.4 <i>Linhagem fúngica</i>	34
	3.2 Meios de cultura.....	34
	3.2.1 <i>Cultivo bacteriano</i>	34
	3.2.2 <i>Cultivo fúngico</i>	34
	3.3 Transformação de bactérias	35
	3.4 Preparação do inóculo fúngico.....	36
	3.5 Preparação das flagelinas purificadas.....	36
	3.6 Remoção de lipopolissacarídeo	36
	3.7 Dosagem da flagelina <i>FliCd</i> purificada	37
	3.8 Eletroforese de proteínas em géis desnaturantes de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).....	37
	3.9 Imunodeteção em filtro de nitrocelulose (Immunoblot).....	38
	3.10 Caracterização da atividade biológica da flagelina.....	39
	3.10.1 <i>Produção in vitro de interleucina 8 (IL-8)</i>	39
	3.10.2 <i>Produção in vivo de interleucina (IL-6)</i>	39

3.11 Síntese e purificação do peptídeo P10.....	39
3.12 Animais.....	40
3.13 Infecção Intratraqueal.....	40
3.14 Protocolo de imunização dos animais.....	40
3.15 Determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC).....	41
3.16 Elisa para quantificação de citocinas: IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- γ	41
3.17 Histopatologia.....	41
3.18 Análise estatística.....	41
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Purificação de flagelina FliCd de <i>S. entérica</i>	42
4.2 Atividade biológica da flagelina FliCd purificada.....	43
4.3 Avaliação das propriedades terapêuticas da formulação vacinal baseada no peptídeo P10 e na flagelina FliCd frente ao desafio com <i>P. brasiliensis</i>	44
4.4 Definição do intervalo e número de doses empregados na imunização com o peptídeo P10 e FliCd.....	51
4.5 Definição de um regime vacinal e avaliação das propriedades terapêuticas anti-Pb após administração por diferentes vias	56
4.6 Associação do tratamento vacinal baseado no peptídeo P10 e FliCd com a quimioterapia específica para a PCM	61
5 DISCUSSÃO.....	70
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose (PCM) primeiramente descrita como blastomicose sul-americana em 1908 por Adolfo Lutz é uma doença crônica, granulomatosa, causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (LUTZ, 1908; LACAZ, 1994). A prevalência dessa doença é delimitada aos países da América latina, sendo que a maioria dos casos é restrita ao Brasil (80%), principalmente nos Estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Rio de Janeiro e Rondônia. Contudo, países como Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina também são considerados como áreas endêmicas (AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2010; COLOMBO et al., 2011). Acredita-se que aproximadamente 10 milhões de pessoas que vivem em áreas endêmicas podem ter entrado em contato com o *P. brasiliensis* e que cerca de 2% dessas pessoas expostas poderão desenvolver a doença (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

A infecção por *P. brasiliensis* acontece geralmente nas primeiras duas décadas da vida, porém a doença pode se desenvolver, após a reativação de um foco quiescente, cerca de quinze anos mais tarde, considerado como período de latência (AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2010; COLOMBO et al., 2011). Talvez esse histórico da doença seja um dos fatores que inclui a PCM na lista de doenças negligenciadas, já que a notificação de casos da PCM não é obrigatória, representando assim um problema de saúde pública no Brasil. A observação de casos de infecção assintomática por *P. brasiliensis* em praticamente todos os estados brasileiros, por meio de testes de hipersensibilidade com paracoccidiodina, é um achado frequente (MARTINEZ, 2010).

O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico que cresce na forma de micélio entre 18 °C a 25 °C, sendo possivelmente a forma infectante. O fungo assume a forma de levedura quando cultivado a 37 °C e nos tecidos dos hospedeiros (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; BORGES-WALMSLEY et al., 2002). Recentemente foi observado que o *P. brasiliensis* não é uma espécie única, análises moleculares demonstraram que existe um complexo com no mínimo três espécies crípticas de *P. brasiliensis*, a primeira espécie presente em vários países endêmicos, a segunda presente somente no Brasil e Venezuela e a terceira espécie restrita somente à Colômbia (MATUTE et al., 2006; COLOMBO et al., 2011).

A infecção por *P. brasiliensis* ocorre por via respiratória, quando conídios produzidos por micélios presentes no solo são inalados, se instalam nos pulmões e se transformam em leveduras formando o complexo primário pulmonar. Esse complexo pode evoluir para a cura, tornar-se latente ou então se disseminar, pelo sistema linfático ou pela corrente sanguínea,

para múltiplos órgãos. A evolução da PCM é dependente de alguns fatores relacionados com o hospedeiro como, sexo, idade, genética e defesa imunológica, assim como de fatores relacionados ao próprio fungo como o tipo de cepa e a dose infectante (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002; MENDES-GIANNINI et al., 2008).

Baseado na interação patógeno-hospedeiro, a PCM apresenta múltiplas manifestações clínicas. Após um indivíduo ter sido infectado, ele poderá desenvolver uma infecção primária seguida pela resolução do problema, podendo ou não ter um foco quiescente da doença, tornando assim um indivíduo saudável, ou então, desenvolver uma das formas clínicas da doença: aguda ou subaguda, forma crônica ou a forma oportunista (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; BERNARD, 2008).

Acredita-se que a forma aguda ou subaguda da doença, conhecida também como tipo juvenil, seja um seguimento da infecção inicial, com período de incubação curto, poucos meses ou até mesmo semanas, sendo caracterizada por algumas características como: resposta imune celular deficiente, aumento na produção de anticorpos específicos, resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (HDT) negativa e proliferação sistêmica elevada com alta taxa de mortalidade. Essa forma da doença é responsável por 3 a 5% dos casos e acomete crianças e adolescentes de ambos os sexos, mas eventualmente pode atingir indivíduos com até 30 anos. (SHIKANAI-YASSUDA et al., 2006; BERNARD, 2008; AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2010).

A forma crônica da doença, conhecida também como tipo adulto, pode variar de uma forma branda a uma forma mais severa que ocorre após a reativação do fungo a partir de um foco quiescente. Nessa fase a doença progride lentamente, de forma silenciosa, podendo levar anos até que seja diagnosticada. Noventa por cento dos casos da PCM apresenta a forma unifocal, quando a doença acomete somente o pulmão, mas a doença pode apresentar-se de forma multifocal quando atinge mais de um órgão simultaneamente. Em ambos os casos as respostas imunológicas celulares são elevadas, há formação de granulomas contendo células fúngicas e esses podem formar sequelas, como uma lesão fibrótica, ou afetar o funcionamento do pulmão por meio de uma doença pulmonar obstrutiva crônica. Essa forma da doença é responsável por mais de 90% dos casos e atinge principalmente indivíduos do sexo masculino com mais de 30 anos. (SAN-BLAS et al., 1992; BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; BORGES-WALMSLEY et al., 2002; SHIKANAI-YASSUDA et al., 2006).

A forma oportunista da doença foi assim classificada por ocorrer também após a reativação de um foco quiescente, porém clinicamente os sintomas são semelhantes ao da

forma aguda da doença e caracterizada por afetar indivíduos imunossuprimidos (BERNARD, 2008).

A quimioterapia é à base do tratamento para PCM em suas diversas formas. A duração do tratamento é determinada por vários fatores como, a virulência do *P. brasiliensis*, o estado da imunidade do hospedeiro, o grau de envolvimento do tecido e o grau da disseminação fúngica. Geralmente o tratamento inicial tem em média duração de 2 a 6 meses e, devido à frequente observação de recidivas da doença, um tratamento prolongado é necessário com duração mínima de dois anos. As drogas utilizadas, em geral, são: a anfotericina B, que atua principalmente na permeabilidade da membrana plasmática provocando danos oxidativos à célula fúngica, derivados sulfamídicos, que atuam na inibição seletiva de enzimas, ou derivados azólicos que geralmente atuam na síntese do ergosterol, um componente vital da membrana das células do fungo (BRAJTBURG et al., 1990; MCGINIS e PASSAREZ, 1998; PETRI JR, 2001; AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2010).

Atualmente o itraconazol oral (100-300 mg/dia) é a droga escolhida para tratamento das formas leves e moderadas da PCM, no entanto, o fluconazol e o cetoconazol também vêm sendo utilizados. Porém como esses medicamentos não estão disponíveis na rede pública, a combinação sulfametoxazol (800-1200 mg) e trimetoprim (160-240 mg) administrado duas vezes ao dia por via oral, é o tratamento mais utilizado na terapêutica de indivíduos com PCM. Em casos de PCM severa a droga utilizada para tratamento é anfotericina B (2-3 mg/kg) administrada por via intravenosa. Embora derivados azólicos e outras drogas possam controlar a progressão da PCM, a formação de seqüelas como fibrose pode representar uma fonte endógena do *P. brasiliensis* passível de reativação ao término do tratamento. Além disso, devido ao longo período de tratamento com essas drogas, sintomas associados à toxicidade resultam na desistência do tratamento e a ocorrência de recidivas (DE CAMPOS et al., 1984; SHIKANAI-YASUDA et al., 2002; AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2010; NARANJO et al., 2010). Outras dificuldades no emprego de derivados azólicos é o custo elevado e a não disponibilidade na rede pública de saúde, o que torna o tratamento de indivíduos mais carentes limitado. Além disso, estudos que demonstraram a resistência de *P. brasiliensis* às sulfonamidas, aos azóis e à anfotericina B reforçam a necessidade de tratamentos terapêuticos mais eficazes, de curta duração e com um menor risco de desenvolvimento de sequelas, como é o caso das vacinas (YASUDA, 2005).

Baseado nesse contexto pesquisas foram feitas no sentido de desvendar os mecanismos de resposta imune envolvidos no controle da PCM. Sendo observado que a proteção da doença é baseada em uma ativação dominante de células T CD4⁺ do tipo Th1

produtoras de IFN- γ e IL-12. Enquanto que a ativação de uma resposta imune associada com altos títulos de anticorpos, com ativação de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2, está associada com um padrão grave da doença (CANO et al., 1995; CALISH e KASHINO, 1998; CANO et al., 1998; ARRUDA et al., 2002). Esse mesmo padrão de resposta imune foi observado por Calich et al. (1985) quando diferentes graus de resistência e susceptibilidade foram encontrados em diferentes linhagens de camundongos frente à infecção por *P. brasiliensis*. A linhagem A/SN, considerada resistente, desenvolve a forma crônica da doença enquanto que a linhagem B10.A mostra-se mais susceptível à doença e desenvolve a forma aguda ou grave da doença.

Estudos envolvendo mecanismos de imunidade inata mostram que a interação inicial do patógeno com o hospedeiro interfere no desenvolvimento de uma resposta imunológica específica responsável por controlar a progressão da doença. Como foi observado, macrófagos de animais susceptíveis são inicialmente muito reativos a antígenos do *P. brasiliensis* e secretam altas quantidades de IL-12, o que acarreta na estimulação de células NK e consequente produção de IFN- γ e secreção de óxido nítrico (ON). Tal condição leva a um padrão de resposta imune inata muito efetivo e, conseqüentemente, controle do crescimento fúngico. No entanto, a produção excessiva de ON inibe o desenvolvimento de células T CD4⁺ por induzir anergia o que resulta no agravamento da doença. Por outro lado, macrófagos dos animais resistentes apresentam um controle inicial pouco eficiente do crescimento fúngico, com baixos níveis de secreção de IL-12 e altos níveis de TGF- β . que, por sua vez, inibe a ativação dos macrófagos com consequente redução na produção de IFN- γ e ON. Essa resposta favorece o desenvolvimento de uma resposta imune celular e os animais conseguem montar lentamente uma resposta específica para *P. brasiliensis* com ativação de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ que controlam o crescimento fúngico (CALICH et al., 2008; PINA et al., 2008).

A produção do IFN- γ leva ao controle de vários patógenos o que ocorre em função de sua propriedade em ativar macrófagos. No entanto, na PCM foi demonstrado que os macrófagos desenvolvem duplo papel, podem ser tanto responsável pela disseminação como pela restrição da infecção por *P. brasiliensis*. O balanço de citocinas certamente desenvolve papel essencial nesse balanço (BERNARD, 2008). Como já foi observado por Cano et al. (1998), o IFN- γ é a citocina protetora mais importante para controlar a infecção tanto em animais resistentes quanto em animais susceptíveis. A IL-12 e o TNF- α também têm importância nesse processo, porém a administração de IL-12 recombinante como forma de tratamento para PCM, apesar de controlar a infecção, induz uma forte resposta inflamatória no

pulmão dos animais demonstrando assim um efeito prejudicial dessa citocina. A citocina IL-4 também tem duplo papel na infecção, em animais susceptíveis ela os protege de uma infecção severa, enquanto que, em animais mais resistentes ela promove o agravamento da doença. A IL-10 é uma citocina conhecida por promover a doença, mas devido ao seu papel em inibir macrófagos ela pode contribuir no controle da PCM (ROMANO et al., 2002; ARRUDA et al., 2002; PINA et al., 2004; ARRUDA et al., 2004; LIVONESI et al., 2008; MOREIRA et al., 2010).

Conhecendo então o tipo de resposta imune envolvida no controle da PCM podemos pensar no desenvolvimento de uma estratégia vacinal cujo objetivo é modular o sistema para um tipo de resposta imunológica capaz de promover a total eliminação dos patógenos latentes. Em relação a esse aspecto, há uma busca crescente de antígenos capazes de ativar respostas imunológicas protetoras. Carboidratos e proteínas são substâncias consideradas seguras para o uso em formulações vacinais.

No caso da PCM, o componente mais estudado do *P. brasiliensis* para o desenvolvimento de uma vacina voltada para o controle da PCM é representado pelo principal antígeno detectado durante a infecção, a glicoproteína extracelular de 43,000 Da (gp43), isolada do sobrenadante de cultura do fungo por cromatografia de afinidade. A gp43 é reconhecida por anticorpos de praticamente todos os indivíduos infectados em vários testes sorológicos, sendo, portanto usada como rotina no monitoramento da doença. O papel desenvolvido pela gp43 na patogenicidade da doença ainda não foi completamente desvendado, porém, em algumas condições experimentais, a gp43 está envolvida, na adesão celular do patógeno ao hospedeiro favorecendo a invasão pelo fungo por ser um ligante de laminina. Por outro lado, foi sugerido que a gp43 pode ser responsável por atuar em um mecanismo de evasão do sistema imune por inibir a atividade fungicida de macrófagos. Mas o seu papel principal parece estar relacionado à indução de uma resposta imune celular protetora por conter epítopos de células T (PUCCIA et al., 1986; PUCCIA e TRAVASSOS, 1991; POPI et al., 2002; SILVA et al., 2004).

Diversas estratégias vacinais que utilizam a gp43 como candidata vacinal têm sido testadas em abordagens profiláticas. Animais imunizados por via subcutânea com gp43 purificada associada ao adjuvante completo de Freund (CFA) apresentaram redução no número de UFCs no pulmão após o desafio com uma cepa virulenta de *P. brasiliensis* (TABORDA et al., 1998). Além disso, a formulação testada foi capaz reduzir a disseminação do fungo para outros órgãos. O desenvolvimento de uma resposta imune humoral e celular foi responsável pela proteção da doença (TABORDA et al., 1998). O contrário foi observado

quando animais BALB/c receberam, por via nasal, gp43 associado à flagelina de *Salmonella*. O número elevado de leveduras viáveis recuperadas nos pulmões dos animais foi acompanhado por altos títulos de anticorpos IgG1 (BRAGA et al., 2009). De fato foi observado que o desenvolvimento de uma resposta imune contra a gp43 é influenciado por células apresentadoras de antígenos (APC). Quando gp43 é processada e apresentada por células dendríticas (CD) induz preferencialmente um padrão de resposta do tipo Th1, e desenvolve uma resposta do tipo Th2 quando é apresentada por células B (ALMEIDA et al., 1998; FERREIRA et al., 2003).

Vacinas de DNA têm sido usadas contra infecções provocadas por diversos patógenos apresentando resultados promissores. O gene da gp43 foi clonado no vetor (VR-1012) sob controle do promotor citomegalovírus (CMV), após a expressão do gene o vetor denominado VR-gp43 foi administrado nos animais por via intramuscular (i.m). Os resultados demonstraram redução significativa no número de UFCs nos órgãos desses animais infectados com leveduras de *P.brasiliensis*, quando comparados com os animais imunizados com o vetor vazio. Essa proteção foi observada após ativação de uma resposta imune celular mista Th1/Th2 (PINTO et al., 2000).

Rodrigues e Travassos em 1994 observaram que a ativação de uma resposta imune protetora mediada por linfócitos T CD4⁺ nos animais imunizados com gp43 era voltadas para um epitopo imunodominante. Após essa observação, diferentes sequências de aminoácidos da gp43 foram selecionadas e analisadas em ensaios de linfoproliferação. A sequência peptídica de 15 aminoácidos (QTLIAIHTLAIRYAN) denominada P10 foi a única sequência capaz de induzir linfoproliferação de linfócitos T previamente estimulados com gp43 e P10 associados ao CFA. A região central do P10 (HTLAIR) é a região essencial do epitopo e está flanqueada por uma combinação de aminoácidos envolvida com a apresentação por moléculas de MHC II de três haplotipos diferentes de camundongos. A natureza promíscua dessa molécula foi também observada para a ligação a muitos alelos do HLA-DR de humanos, propriedade essencial para um candidato vacinal a ser administrada em uma população geneticamente heterogênea (TABORDA et al., 1998; IWAI et al., 2003).

Resultados promissores utilizando o peptídeo P10 em regimes profiláticos foram obtidos de diversas formas. Em 1998, Taborda e colaboradores utilizaram por via parenteral o peptídeo P10 emulsificado em CFA. Os resultados obtidos demonstraram uma infecção pulmonar 200 vezes menos intensa quando comparado com os animais controles, além disso, essa formulação foi capaz de evitar a disseminação do fungo para o baço e fígado mesmo após três meses de infecção. O efeito protetor do P10 é atribuído a forte resposta imune

celular mediada por IFN- γ e IL-2 por linfócitos T, tendo a vantagem de não induzir resposta imune humoral.

Com o objetivo de melhorar a entrega do peptídeo P10 para o sistema imune, um complexo na forma de múltiplos peptídeos antigênicos (MAPs) foi sintetizado. Os MAPs têm sido utilizados como alternativa para amplificar a imunogenicidade de peptídeos sintéticos podendo assim substituir o uso de adjuvantes que são prejudiciais para o hospedeiro como é o caso do CFA. O complexo construído, denominado M10, apresentava 4 sequências peptídicas correspondente ao P10 ligado a três cadeias de lisina contendo glicina na posição C-terminal. Uma única dose de M10 foi capaz de reduzir significativamente o número de UFCs no pulmão, baço e fígado. Porém, devido a dificuldades no processo de síntese e purificação da molécula, o uso desta, como candidato vacinal mostrou-se inviável (TABORDA et al., 2004).

Resultados promissores foram obtidos quando a flagelina *FliCd* de *Salmonella* Dublin foi utilizada como adjuvante em regime profilático de vacinação. A formulação vacinal baseada no peptídeo P10 e *FliCd* administrada nos animais por via intranasal (i.n) induziu um padrão de resposta imune celular do tipo Th1 com ativação predominante de IL-12 e IFN- γ respectivamente e elevados níveis de proteção a desafios com a cepa Pb18. (BRAGA et al., 2009).

Uma estratégia vacinal que atue terapêuticamente na PCM seria uma prioridade frente a perspectiva reduzida de uma vacinação preventiva em função da incidência da doença e o problema de recidiva em pacientes submetidos à quimioterapia. Estudos que empregaram o peptídeo (P10) como ferramenta terapêutica mostraram resultados promissores. O peptídeo P10 foi incorporado em partículas de poli (ácido lático ácido glicólico) (PLGA), que atuam de forma a liberar o antígeno de forma controlada e gradual. Os animais que receberam as partículas de PLGA em associação com sulfametaxazol/trimetoprim foram sacrificados 30 e 90 dias após o início do tratamento e em ambos os períodos o número de UFCs nos pulmões foi drasticamente inferior aos animais controles (AMARAL et al., 2010).

Quando o peptídeo P10 foi utilizado em conjunto com a quimioterapia específica para *P.brasiliensis* um efeito protetor aditivo foi observado (MARQUES et al., 2006, 2008). Dois protocolos diferentes foram testados para medir o efeito de uma vacina baseada no peptídeo P10 combinado ao CFA (quatro doses). No primeiro, o tratamento com as drogas antifúngicas começou 48 h após o desafio com uma cepa virulenta de *P. brasiliensis*. No segundo protocolo o tratamento foi iniciado 30 dias após a infecção. Os animais receberam por 30 dias consecutivos itraconazol, fluconazol, cetoconazol, sulfametaxazol ou a combinação de sulfametaxazol/trimetoprim. Nos dois ensaios a combinação da vacina com as

drogas antifúngicas controlou o crescimento do fungo no pulmão dos animais infectados. Os resultados indicam que a estratégia modulou as respostas imunológicas induzidas e reduziu o tempo do tratamento com os quimioterápicos. Esse efeito protetor aditivo também foi observado quando os animais foram tratados com dexametasona para desenvolver o padrão grave da doença. Os resultados observados mostraram que mesmo em casos de anergia o tratamento foi eficiente no controle do crescimento fúngico (MARQUES et al., 2008).

Contudo vacinas baseadas em peptídeos ainda não são, em geral, protetoras em função da baixa imunogenicidade dessas moléculas. Polipeptídeos são facilmente degradados em diferentes ambientes e apresentam problemas de entrega ao sistema imune. Dessa forma a incorporação de um adjuvante com propriedades de direcionar o antígeno a células apresentadoras de antígenos para o desencadeamento de uma resposta imune celular funcional e/ou que apresente propriedades inflamatórias que propiciem a ativação do sistema imune inato, por exemplo, representa um passo fundamental para o desenvolvimento de formulações vacinais baseadas em peptídeos (TRAVASSOS et al., 2008). Infelizmente os resultados experimentais baseados no adjuvante de Freund, embora promissores, não são compatíveis ao uso em seres humanos em função da forte reação inflamatória gerada.

No entanto há um número limitado de adjuvantes disponíveis para o uso em humanos, sendo que o único aprovado no Brasil até hoje é o hidróxido de alumínio, um ativador de respostas do tipo Th2. Uma alternativa de adjuvante para formulações vacinais anti-PCM é representada pela flagelina, como demonstram resultados anteriores (BRAGA et al., 2009).

A flagelina consiste em uma proteína monomérica de aproximadamente 500 aminoácidos que compõe o filamento flagelar bacteriano, presente na superfície da bactéria, proporcionando mobilidade e auxiliando na adesão às células do hospedeiro (RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004). Diferentes flagelinas são produzidas por várias sorovares de *Salmonella enterica* (FliCd, FliCi, FliJb) que se assemelham por conter regiões N - e C - terminais conservadas que flanqueiam a região central hipervariável. Essa região central da flagelina é rica em epitopos B e está exposta como uma folha β -pregueada na superfície externa do filamento flagelar e apresenta apenas 30% de homologia entre os diferentes sorovares de *Salmonella*. Os domínios conservados formam uma estrutura em α -hélice necessária à montagem do filamento flagelar, função de mobilidade e interação com o receptor Toll-like 5 (TLR 5) do sistema imune inato (YONEKURA; MAKI-YONEKURA; NAMBA, 2003; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004; MURTHY et al., 2004).

O efeito adjuvante exercido pela flagelina se dá basicamente pela ativação de APCs. Mais precisamente por uma estimulação direta de células dendríticas CD11c⁺ tlr5^{+/+} embora,

esse receptor esteja presente na superfície de monócitos, macrófagos, e células epiteliais (MEANS et al., 2003). Após ocorrer essa ativação por meio de sua ligação ao TLR 5, membro de uma família de moléculas de superfície responsáveis pelo reconhecimento de estruturas específicas de patógenos microbianos, uma cascata de sinalização é ativada por meio de proteínas adaptadoras, incluindo o fator de diferenciação mielóide (MyD88) e o receptor de interleucina 1 associado a quinases. Essa interação resulta na ativação e translocação do fator nuclear de transcrição (NF- κ B) para o núcleo da célula, onde se inicia a expressão de diversos genes que codificam citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α , LT α , LT β e GM-CSF), moléculas de adesão (ICAM, VCAM) e enzimas induzíveis (iNOS e COX-2), que desempenham papel fundamental na resposta imune inata e adquirida. (ZHANG e GHOSH, 2001, ANDERSEN-NISSEN et al., 2007; MIZEL e BATES, 2010).

A estimulação do TLR na superfície de CD promove sua ativação e maturação, o que inclui aumento da expressão do MHC e moléculas co-estimuladoras (B7-1 e B7-2), bem como secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Essa ativação representa uma etapa importante para obtenção de uma resposta imune adaptativa. Assim as CD ativadas possuem capacidade de sensibilizar células T virgens, conseqüentemente, a flagelina é considerada um imunopotencializador para células T e B (AKIRA e TAKEDA, 2004; CUADROS et al., 2004; RANVIDRAN e MCSORLEY, 2005; HONKO et al., 2006).

Além de suas propriedades adjuvantes, a flagelina representa uma molécula atraente para a entrega e o direcionamento de antígenos, uma vez que epitopos para a ativação de linfócitos B, T CD4⁺ e T CD8⁺ podem ser inseridos na molécula ou apenas coadministrados para serem transportados e apresentados ao sistema imune (HONKO et al., 2006; MIZEL e BATES, 2010). Flagelinas se tornam atraentes para uso em vacinas humanas por necessitar de baixas doses para geração de respostas imunológicas aumentadas, ausência de efeitos colaterais, e facilidade de produção em condições GMP.

Em pesquisa anterior desenvolvida no laboratório observamos efeitos promissores da flagelina *FliCd* como adjuvante em formulações vacinais profiláticas quando combinada ao peptídeo P10 do *P. brasiliensis*. Os animais imunizados com três doses dessa formulação vacinal por via intranasal apresentaram um padrão de resposta imune do tipo Th1. Além disto, animais imunizados conseguiram eliminar a carga fúngica no pulmão resultando na primeira formulação vacinal de mucosa com efeito protetor em camundongos frente à PCM. A utilização da via de imunização i.n apresenta diversas vantagens incluindo facilidade de administração, redução de riscos de contaminação com outros patógenos e capacidade de induzir imunidade no tecido pulmonar (BRAGA et al., 2009).

Baseado nesses resultados anteriores e devido a grande necessidade do desenvolvimento de uma estratégia terapêutica voltada para o controle da PCM, avaliamos no presente trabalho, os efeitos terapêuticos da vacina P10 e *FliCd* em condições terapêuticas, associada ou não, à quimioterapia antifúngica.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O projeto tem como principal objetivo avaliar a eficácia terapêutica da formulação vacinal baseada no peptídeo P10 derivado da gp43 do *P. brasiliensis* e a flagelina FliCd de *Salmonella* em associação, ou não, a antibióticos com ação antifúngica.

2.2 Objetivo específico

- ❖ Analisar o efeito protetor terapêutico da formulação vacinal empregando diferentes concentrações do peptídeo P10;
- ❖ Determinar o melhor regime vacinal em relação ao número e intervalo entre as doses;
- ❖ Avaliar a influência da via de administração da vacina;
- ❖ Verificar se a adição de antifúngicos resulta em um efeito protetor aditivo em animais imunizados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens e plasmídeos

3.1.1 Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas nesse estudo estão descritas na tabela abaixo. A linhagem *S. enterica* pv. Dublin (*S. Dublin*) SL5928 é uma linhagem atenuada não móvel. A *S. Dublin* SL5928 foi transformada com o plasmídeo pLS408 e denominada *S. Dublin* SL5930. O cultivo bacteriano foi feito em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina (100 µg/mL), a 200 rpm e a 37 °C.

Tabela 1- Linhagens bacterianas utilizadas no presente estudo

Linhagem	Características relevantes	Referência
<i>S. Dublin</i>		
SL5928	<i>aroA his fliC::Tn10</i>	Newton et al., 1989
SL5930	SL5928 transformada com o plasmídeo pLS408; móvel	Newton et al., 1989

3.1.2 Linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas nesse estudo estão descritas na tabela 2. Células Hek293 transfectadas e não transfectadas com plasmídeo contendo o gene que codifica para o receptor TLR 5 foram cultivadas por duas semanas em meio DMEN adicionado de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil).

Tabela 2 - Linhagens celulares utilizadas no presente estudo

Linhagem	Características relevantes	Referência
HEK 293	Células embrionárias de rim humano	Graham et al., 1977
HEK 293/TLR5	HEK 293 transfectada com TLR5 humano	Invivogen

3.1.3 Plasmídeos

O plasmídeo pLS408 (6,0 kb) deriva do pUC19 e contém um inserto de 3,35 kb de DNA genômico de *S. Muenchen* que codifica o gene *fliCd* (*H1-d*).

3.1.4 Linhagem fúngica

A linhagem virulenta de *P. brasiliensis* (Pb18) foi mantida em meio semi-sólido Fava-Netto a 37 °C e usada após sete dias de cultivo.

3.2 Meios de cultura

3.2.1 Cultivo bacteriano

Para o cultivo da linhagem bacteriana foi utilizado o meio LB:

- 10 g triptona
- 10 g NaCl
- 5 g extrato de levedura
- q.s.p 1L de água destilada

3.2.2 Cultivo fúngico

A linhagem Pb18 foi cultivada em meio semi-sólido Fava-Netto:

- 3 g Protease peptona
- 10 g Peptona (Difco, Detroit, M.I., USA)

- 5 g Extrato de Carne
- 5 g NaCl
- 5 g Extrato de levedura (Difco)
- 40 g Dextrose
- 18g Agar (Difco)
- q.s.p 1L de água destilada (pH 7,2 – 7,4)

Para análise das UFCs o fungo foi cultivado em meio sólido Brain Heart Infusion (BHI):

- 37 g BHI (Difco)
- 20 g Ágar (Difco)
- q.s.p 1L

Após o processo de autoclavagem esse meio foi suplementado com 4% (vol/vol) de soro fetal bovino (Cultilab), 5% de filtrado de cultura do isolado 192 de *P. brasiliensis* e 1% de estreptomicina e penicilina (Sigma, St Louis, MO).

3.3 Transformação de bactérias

As células competentes para eletroporação foram preparadas como recomendado pelo fabricante do aparelho (Gene-Pulser, Biorad). O cultivo bacteriano realizado em meio LB foi empregado na D.O. de 0,5 (600 nm). As células foram mantidas em gelo e centrifugadas durante 15 minutos a 6.000 x g. O precipitado foi ressuscitado em 500 mL de água MiliQ gelada contendo 10% de glicerol e novamente foi realizada uma centrifugação. As células foram lavadas com a mesma solução em um volume final de 250 mL, centrifugadas e ressuspensas em 50 mL da solução contendo glicerol 10%. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de água gelada e glicerol a 10% e o volume final foi distribuído em tubos com 40 µl cada e congelados rapidamente a -80°C. A cada alíquota foi misturado a 1 ou 2 µl de DNA e a mistura foi transferida para uma cuba de eletroporação. O pulso elétrico utilizado seguiu as recomendações do fabricante. Imediatamente após o pulso foi adicionado 1 mL de meio LB diretamente na cuba e transferido para um tubo de ensaio e incubado a 37 °C durante 1h sob agitação. As células foram então plaqueadas em meio LB, acrescido de ampicilina, e incubadas novamente a 37 °C.

3.4 Preparação do inóculo fúngico

O fungo foi coletado e lavado em solução salina tamponada (PBS pH 7,2) por três vezes e deixou-se decantar as partículas maiores e, com o sobrenadante, fez-se a contagem das leveduras viáveis em câmara de Neubauer após coloração por trypan blue (Sigma, St. Louis, MO, USA).

3.5 Preparação das flagelinas purificadas

A linhagem de *S. Dublin* utilizada para a extração do flagelo foi semeada em 50mL de meio LB com 100 µg de ampicilina e incubada a 37 °C com agitação de 80 rpm durante 16 h. As células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 2 mL de PBS. A suspensão bacteriana foi agitada em homogeneizador tipo “blender” para quebra dos flagelos (4 ciclos de 2 min em intervalos de 2 min no gelo). Após a remoção das células por centrifugação, o sobrenadante foi coletado e adicionado 3 a 4 volumes de acetona gelada para precipitação da flagelina presente. Após 30 min de repouso a -20 °C, o material foi centrifugado e o precipitado ressuspenso em aproximadamente 0,5 mL de PBS (BRAGA et al, 2008). As flagelinas purificadas passaram por um tratamento (65 °C por 30 min) para dissociação dos monômeros.

3.6 Remoção de lipopolissacarídeo

Após a obtenção das flagelinas purificadas um procedimento para remoção de LPS foi realizado utilizando o triton x-114. Em 1mL de proteína adicionou-se 100 µl de triton x-114 a 10% e misturou cuidadosamente com a pipeta. Em seguida incubou a amostra por 30 min no gelo, a cada 10 min a amostra era homogeneizada em aparelho tipo vórtex. Após esse procedimento, a amostra foi incubada na temperatura de 37 °C por 10 min e centrifugada por 5 min a 3.000g em temperatura ambiente para então coletar a fase aquosa cuidadosamente para não haver contaminação com a fase oleosa. Esse procedimento foi realizado 10 vezes e após a quantificação da endotoxina pelo teste LAL (Lisado de Amébócitos de *Limulus*), (Lonza Ltda., São Paulo, SP, Brasil) obtivemos a proteína dentro dos limites aceitáveis de LPS.

3.7 Dosagem da flagelina FliCd purificada

A quantidade total de proteínas foi determinada usando-se o kit BCA (Pierce, Rockford, II, USA) e como padrão a albumina bovina na concentração de 2 mg/mL, com diluições sucessivas. A leitura da densidade óptica foi realizada a 600 nm em leitor de placa (Multiscan MS-Labsystem, Waltham, MA, USA).

3.8 Eletroforese de proteínas em géis desnaturantes de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

A análise da pureza das flagelinas purificadas foi determinada em gel de poliacrilamida.

- Gel de Separação (12,5%):
 - Acrilamida/Bis 30% C=1,6% 1,56 mL
 - 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 1,00 mL
 - Água bidestilada 1,14 mL
 - SDS 10% 37,5 µL
 - PSA 10% 37,5 µL
 - TEMED 1,5 µL
- Gel de empilhamento (5%):
 - Acrilamida/Bis C=5% 0,290 mL
 - 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,220 mL
 - Água bidestilada 1,19 mL
 - SDS 10% 17 µl
 - PSA 10% 17 µl
 - TEMED 1,7 µl
- Tampão de amostra:
 - 2% SDS
 - 4% 2-mercaptoetanol
 - 10% glicerol
 - 0,06 M Tris-HCl pH6,8
 - 4mM EDTA
 - Azul de bromofenol adicionado livremente

A coloração foi feita por com azul de Coomassie:

- 0,25% Azul de comassie
- 50% metanol
- 10% ácido acético

A descoloração do gel foi feita por aquecimento em água no forno de microondas por 2 minutos.

3.9 Imunodeteção em filtro de nitrocelulose (Immunoblot)

Após a separação das proteínas por eletroforese, estas foram transferidas para um filtro de nitrocelulose (Hybond-C Extra Amershan) em solução de transferência durante 1h com corrente aplicada de 30mA.

- Tampão de transferência
 - 39 mM glicina
 - 20% metanol
 - 0,0375% SDS
 - 48mM Tris-HCl

Após a transferência os sítios não específicos de ligação do anticorpo à nitrocelulose foram bloqueados em solução de 2% de leite desnatado em PBS e 0,05% de Tween20 por 12 h a 4 °C. Após 1 h de incubação com agitação, o filtro foi lavado 3 vezes com PBS-T durante 10 min para cada lavagem. A seguir, o filtro foi incubado por 1 h, sob agitação, com o anticorpo anti-flagelina diluído 1:3000 em solução bloqueadora. O filtro foi lavado novamente 3 vezes (5 min cada lavagem) e incubado com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:3000 durante 1 h com agitação. Para revelação por quimioluminescência o filtro foi lavado 3 vezes (5 min cada) com tampão PBS-T. O reagente de revelação (Pierce, Kit ECL, Amersham) foi aplicado à membrana, de acordo com as instruções do fabricante. A solução foi preparada a partir de 1000 µl do reagente 1 e 1000 µl do reagente 2, misturados no momento do uso. Em seguida a membrana foi colocada dentro de um cassete fotográfico e recoberta por uma folha de acetato de celulose. A revelação foi feita em câmara escura e o filme foi exposto por cerca de quinze minutos e após, submetido à revelação com revelador fotográfico (GBX, KodaK).

3.10 Caracterização da atividade biológica da flagelina

3.10.1 Produção in vitro de interleucina 8 (IL-8)

Células Hek293 transfectadas e não transfectadas com plasmídeo contendo o gene que codifica para o receptor TLR 5 (Invivogen, San Diego, USA) foram cultivadas por duas semanas em meio DMEN adicionado de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab), na presença ou ausência de antibiótico blasticidina (1 µg/mL), respectivamente. Um dia antes do ensaio as células foram tratadas com Tripsina (Cultilab), lavadas duas vezes com DMEN + 10% SFB, e ajustadas para aplicar 50.000 células viáveis por poço. As células foram incubadas durante 12 h em estufa de CO₂, 37 °C, na presença ou ausência de blasticidina. No dia seguinte as células foram incubadas por cerca de 5 h com a flagelina FliCd nas seguintes concentrações: 1 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,01 µg/mL; 0,001 µg/mL; 0,0001 µg/mL. Após este período o sobrenadante da cultura celular foi coletado e armazenado para quantificação de IL-8 por ELISA utilizando-se o kit BD OptEIA TM Mouse IL-8 ELISA set (BD Biosciences, San Diego, CA) (cat n. 555244).

3.10.2 Produção in vivo de interleucina (IL-6)

Camundongos BALB/c (5 animais/grupo) foram inoculados com uma dose de flagelina FliCd, via i.p., na concentração de 5,0 µg/ em 200µl por dose. Após 0,5 h; 2 h; 6 h e 12 h o soro dos animais foi coletado e armazenado a -80°C para quantificação de IL-6 por ELISA utilizando-se o kit BD OptEIA TM Mouse IL-6 ELISA set (BD Biosciences, San Diego, CA).

3.11 Síntese e purificação do peptídeo P10

O peptídeo sintético P10 (QTLIAIHTLAIRYAN) foi adquirido na empresa Sinapse e produzido pela empresa GeneScript.

3.12 Animais

Camundongos machos da linhagem BALB/c com média entre 6 a 8 semanas de idade foram obtidos junto ao Biotério de Isogênicos da Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo. Os animais foram manuseados de acordo com as normas do Comitê de Ética do Instituto.

3.13 Infecção Intratraqueal

Os animais foram desafiados por via intratraqueal com $3 \times 10^5/50$ μ l células de levedura/animal do isolado virulento da linhagem Pb18. Previamente, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 300 μ l de uma solução contendo 80 mg/kg ketamina e 10 mg/kg de xilazina (União Química, Brasil). Após dez min uma incisão foi feita na pele do pescoço para exposição da traquéia e com o auxílio de uma seringa, 50 μ l da suspensão de leveduras foi injetada. Em seguida, a incisão foi suturada e os animais foram mantidos aquecidos até acordarem da anestesia.

3.14 Protocolo de imunização dos animais

Para avaliação da formulação vacinal utilizou-se basicamente três regimes vacinais diferentes. O primeiro regime vacinal consistiu em três doses com diferentes concentrações do peptídeo P10 (2,5; 5; 10 e 20 μ g) e 5 μ g de flagelina, administrado por via nasal nos dias 31, 45 e 60 após o desafio. O segundo regime vacinal consistiu em três, quatro e cinco doses com 2,5 μ g peptídeo P10 e 5 μ g flagelina, administrado por via nasal com intervalo de uma semana entre cada dose. No terceiro regime vacinal, os animais receberam quatro doses por via nasal e sub-cutânea nos dias 31, 38, 45 e 52 após o desafio. Em outra etapa, o mesmo regime vacinal foi seguido, no entanto, a formulação vacinal foi associada ao sulfametoxazol/trimetropim (Bac-sulfitrin, Ducto, Brasil) administrado na concentração 15/3 mg/kg de peso por via intraperitoneal por 30 dias consecutivos. A avaliação da formulação vacinal foi realizada após 90 dias de infecção. Grupos controles foram imunizados com PBS estéril, 5 μ g de flagelina e 20 μ g de P10 apenas. Um grupo foi imunizado com 4 doses do peptídeo P10 emulsificado em Adjuvante Completo Freund (1^o dose), administrado no coxim plantar e mais 3 doses subsequentes com adjuvante incompleto de Freund (IFA) na proporção 1:1 (vol/vol) por via parenteral.

3.15 Determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC)

Os animais foram sacrificados após 90 dias de infecção e a carga fúngica foi avaliada por meio da recuperação de fungos viáveis. Amostras de pulmão, baço e fígado foram removidas, pesadas e homogeneizadas manualmente em 1 mL de PBS estéril. As amostras foram plaqueadas (100 µl) em meio BHI suplementado com 4% (vol/vol) de soro fetal bovino (Gibco), 5% de filtrado de cultura do isolado 192 de *P. brasiliensis* e 1% de estreptomicina e penicilina (Sigma). As placas de petri foram incubadas a 37 °C por aproximadamente 10 dias, em seguida as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC por grama de tecido.

3.16 Elisa para quantificação de citocinas: IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- γ

Noventa dias após a infecção dos animais, parte do pulmão foi macerado em solução contendo inibidor de proteases (Sigma). As dosagens de citocinas foram feitas, quantitativamente, por meio ELISA de captura utilizando o kit BD OptEIA (BD Pharmingen, San Diego, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.17 Histopatologia

Amostras de pulmão foram fixadas em 10% de formalina (Merck, Alemanha). Essas amostras foram encaminhadas para o laboratório de Histologia do departamento de imunologia do instituto de ciências biomédicas da Universidade de São Paulo para inclusão em parafina, preparação da lâmina e coloração pelo método H/E para posteriormente serem analisadas microscopicamente (Optiphot-2 Nikon, Tokyo, Japan).

3.18 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA) e a análise de variância (ANOVA) foi realizada seguida do pós teste de Tukey. O resultado foi considerado significativo quando o $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Purificação de flagelina FliCd de *S. enterica*

Como primeira etapa do trabalho proposto, foi feita a purificação de flagelina da linhagem de *S. enterica* sorovar Dublin. A linhagem foi modificada para não expressar o antígeno flagelar nativo e transformada com um plasmídeo (pLS408) que codifica a flagelina FliCd de *S. Muenchen* (SL5930). Após o tratamento para remoção dos flagelos, a proteína purificada passou por um tratamento a 65 °C por 30 minutos para dissociação dos monômeros de flagelina. Em seguida essa amostra foi corrida em gel de poliacrilamida para análise de sua pureza e submetida ao ensaio de imuno blot com anticorpos anti-flagelina (FliCd) como observado na figura 1.

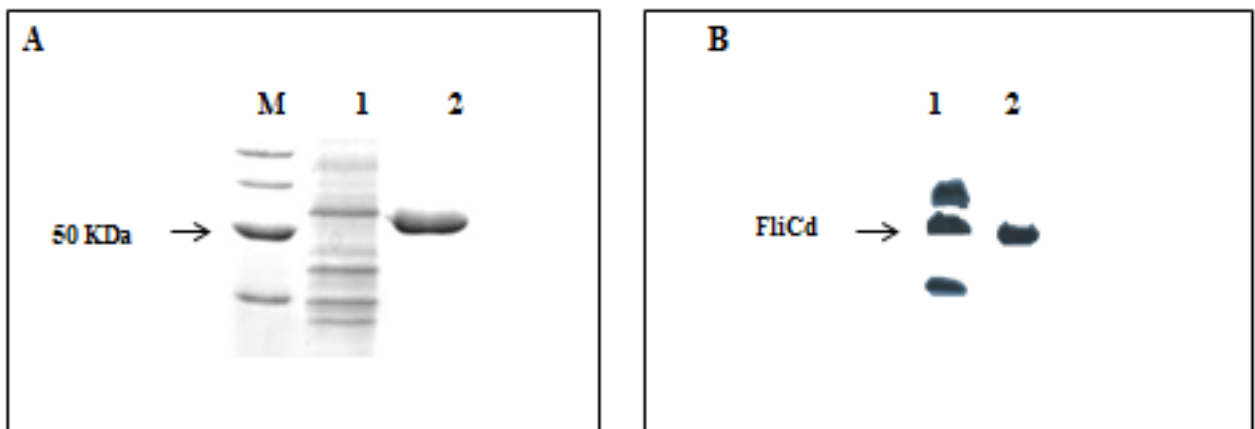


Figura 1 - Extração de flagelina FliCd nativa de *S. Muenchen*. Essa linhagem foi semeada em 50mL de meio LB com 100µg de ampicilina e incubada a 37°C com agitação de 200 rpm. No dia seguinte as células bacterianas foram tratadas para remoção dos flagelos e ao sobrenadante foi adicionado acetona para precipitação da flagelina. A análise de pureza da amostra foi determinada em gel de poliacrilamida (12,5%) e corada com azul de comassie (A) e submetida ao ensaio de imuno blot (B). Amostras: 1, extrato total; 2, flagelina purificada; M, marcador de peso molecular (invitrogen).

Após o processo de purificação a flagelina FliCd utilizada nos experimentos, seguiu-se o processo de remoção de LPS. Esses componentes celulares são os principais contaminantes encontrados em amostras extraídas de bactérias gram-negativas impedindo a avaliação da real atividade biológica de compostos imunomoduladores. Além disso, baixas quantidades de endotoxina presentes nas preparações proteicas podem causar efeitos colaterais ao hospedeiro, como choque endotóxico, dano tecidual e até mesmo morte. Por tais motivos a remoção do

LPS é fundamental na preparação de imunobiológicos. Assim o tratamento para remoção de endotoxina foi realizado e a quantidade de LPS presente nestas amostras foi medida por meio do teste LAL. Os níveis encontrados nestas preparações foi de 1,12 EU por 1 µg de proteína, estando dentro da faixa compatível para uso clínico.

4.2 Atividade biológica da flagelina FliCd purificada

Com o objetivo de verificar se a proteína purificada é funcional avaliamos a atividade biológica da flagelina (FliCd) tanto *in vitro*, por meio da produção de interleucina 8 (IL-8) por células HEK293 transfectadas para expressar o receptor TLR5, como *in vivo*, por meio da medição de interleucina 6 (IL-6) no soro de animais tratados parenteralmente com a preparação. A figura 2 mostra a produção de IL-8 mediada pela ligação da flagelina FliCd nativa ao receptor TLR5 expresso pelas células HEK293. Os resultados mostram uma ativação linear na produção de IL-8 com quantidades de flagelina que variaram de 0,1 ng a 1 µg. Os resultados apresentados mostram que a flagelina é capaz de ligar ao receptor TLR5 e ativar o regulador transcricional NF-κB. Como controle, células HEK293 não transfectadas com TLR5 apresentaram concentrações menores de IL-8 quando testadas nas mesmas condições.

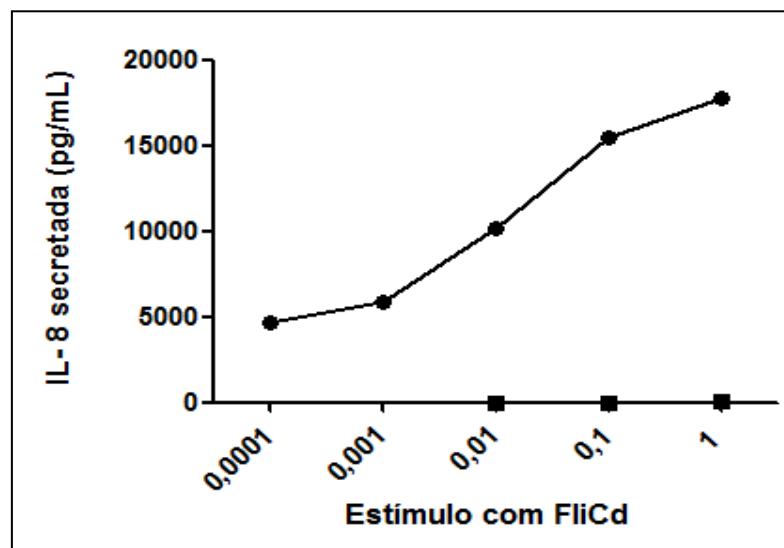


Figura 2 - Atividade biológica *in vitro* da flagelina FliCd. Produção de IL-8 em células HEK293 transfectadas para expressar o TLR5 (círculos) ou não transfectadas com TLR5 (quadrados) estimuladas com diferentes concentrações de FliCd por 5 h. A quantificação de IL-8 foi determinada no sobrenadante de cultura por ELISA.

O ensaio de IL-6 foi realizado com o objetivo de confirmar o efeito imunomodulador de FliCd *in vivo* por meio de sua ligação ao receptor TLR5 presente em diferentes células do sistema imunológico, assim como em outros tecidos celulares, e com a consequente ativação da cascata de sinalização que leva à ativação do regulador transcricional NF- κ B. Os resultados apresentados na figura 3 mostram que a flagelina foi capaz de estimular a produção de IL-6 *in vivo* quando comparado com os animais que receberam apenas PBS demonstrando assim seu potencial em ativar células do sistema imune inato. Os resultados indicam que o pico máximo de produção de IL6 foi detectado 2 h após a administração pela via i.p. de 5 μ g de FliCd em camundongos BALB/c.

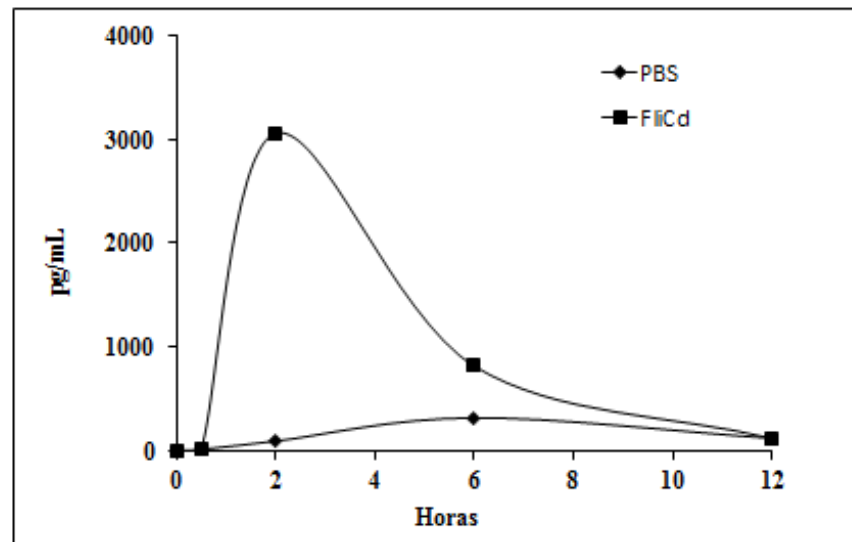


Figura 3 - A flagelina FliCd recombinante é capaz de ativar a produção de IL-6 *in vivo*. Produção de IL-6 (pg/mL) em diferentes tempos (0,5 h; 2 h; 6 h e 12 h) após a inoculação de 5 μ g de flagelina pela via i.p. em camundongos BALB/c (quadrados). Os animais controles receberam apenas PBS e foram sangrados nos mesmo período (losângulos).

4.3 Avaliação das propriedades terapêuticas da formulação vacinal baseada no peptídeo P10 e na flagelina FliCd frente ao desafio com *P. brasiliensis*.

Resultados anteriores demonstraram que a combinação do peptídeo P10 derivado da glicoproteína de 43 kDa (gp43) de *P. brasiliensis* e a FliCd de *S. Muenchen* foi capaz de conferir proteção profilática completa ao desafio com a linhagem Pb18 de *P. brasiliensis* (BRAGA et al., 2009). Em uma primeira avaliação das propriedades terapêuticas da formulação vacinal, imunizamos camundongos BALB/c machos com diferentes

concentrações do peptídeo P10 (20, 10, 5 e 2,5 µg) em conjunto com 5 µg de FliCd, seguindo o regime vacinal descrito na figura 4.

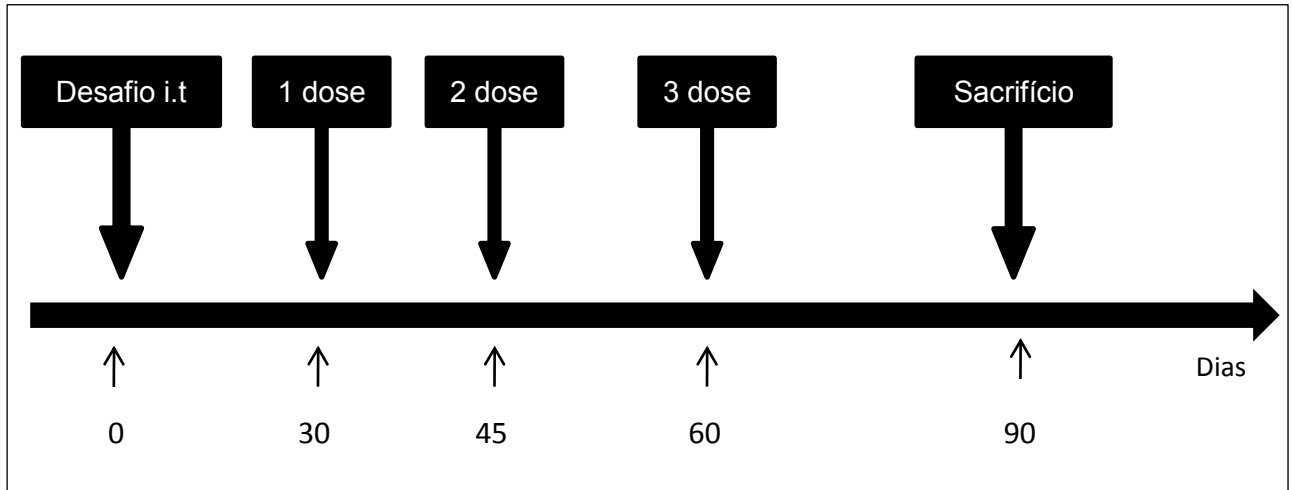


Figura 4 - Regime vacinal empregado para avaliar o efeito terapêutico da formulação vacinal P10 e flagelina. O desafio foi feito com 3×10^5 leveduras da linhagem Pb18 de *P. brasiliensis* por via i.t. e após 30 dias de infecção os animais receberam 3 doses da vacina por via i.n. com intervalo de 15 dias. Trinta dias após a última dose os animais foram sacrificados e o número de UFC, dosagem de citocinas e análises histológicas foram determinados nos pulmões dos animais infectados.

Os resultados obtidos a partir da determinação das UFCs demonstraram que houve uma leve redução da carga fúngica nos animais vacinados com as formulações contendo 2,5 ou 20 µg de P10 com 5 µg de flagelina, quando comparados com os animais somente desafiados. Apesar dessa redução, nenhuma das formulações utilizadas foi capaz de prevenir a disseminação do fungo para outros órgãos, como mostra a figura 5.

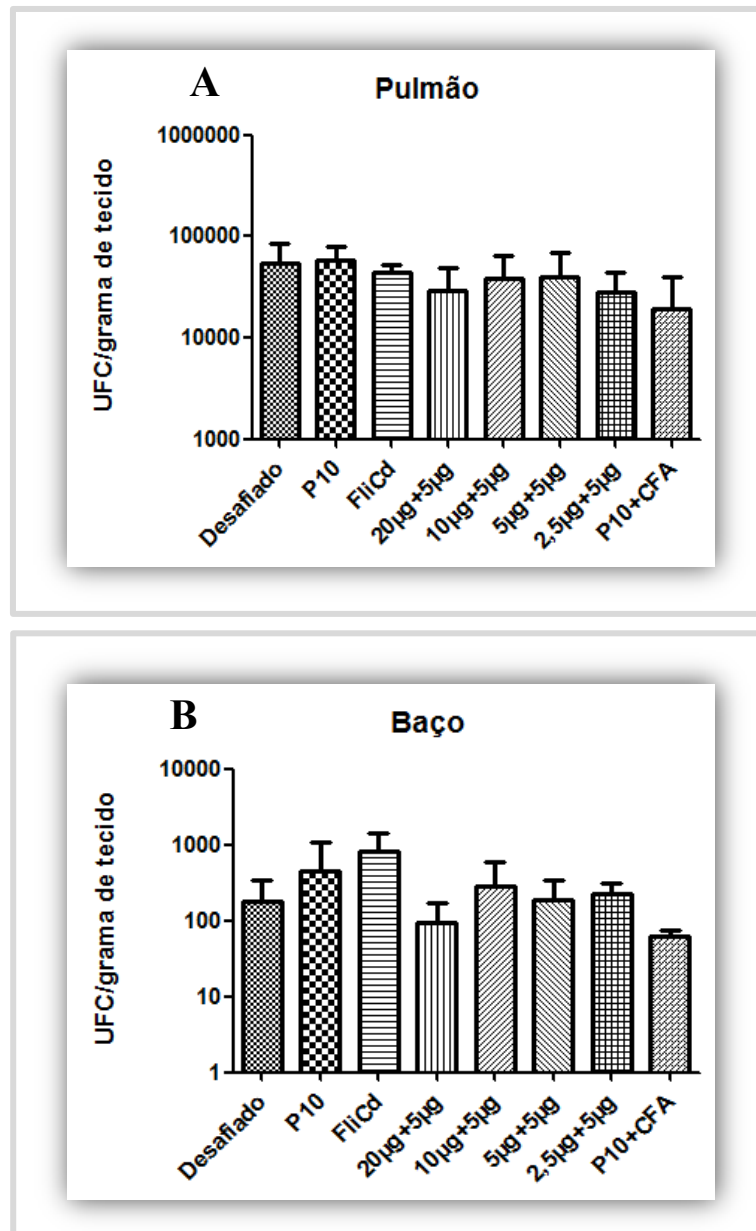


Figura 5 - Efeito terapêutico sobre a infecção com a linhagem Pb18 em camundongos BALB/c imunizados com formulações vacinais constituídas por diferentes concentrações do peptídeo P10 e FliCd. Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em diferentes órgãos de animais infectados e submetidos ao regime vacinal terapêutico com diferentes formulações vacinais contendo P10 e FliCd. Detecção da carga fúngica recuperada no pulmão (A), baço (B) e fígado (C) de animais infectados pela via i.t. com 3×10^5 leveduras da linhagem Pb18. Trinta dias após a infecção os animais receberam 3 doses das vacinas contendo diferentes concentrações do peptídeo P10 (20, 10, 5 e 2,5 µg) coadministrados com FliCd por via i.n com intervalo de 15 dias. Grupos controles foram imunizados com PBS estéril (animal somente desafiado), 5 µg de flagelina e 20 µg de P10 apenas. Um controle positivo foi feito com animais imunizados com 3 doses de P10 emulsificado em CFA (1ª dose), administrada no coxim plantar, e mais 2 doses subsequentes com IFA, na proporção 1:1 (vol/vol), por via subcutânea. Todos os animais foram sacrificados depois de noventa dias de infecção. Não houve diferença significativa quando o grupo desafiado foi comparado com os grupos imunizados. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

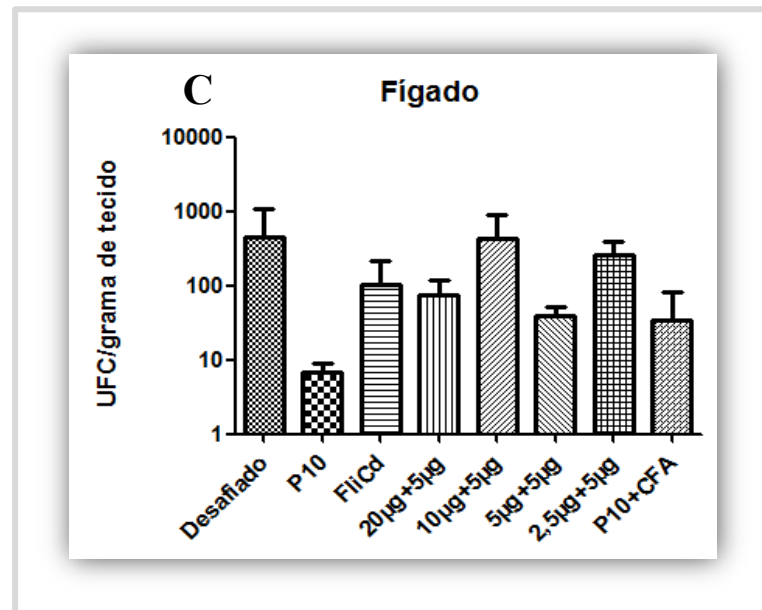


Figura 5 - (continuação)

A dosagem de citocinas em células pulmonares dos animais submetidos aos tratamentos vacinais foi feita para verificar o tipo de resposta (T auxiliar ou T “helper”) induzida nos animais submetidos à imunização com P10 e *FliCd*. Para isso realizou-se a quantificação de citocinas associadas com a proteção da doença (IFN- γ , IL-12) e citocinas associadas com a exacerbação doença (IL-4 e IL-10). Os resultados indicaram a presença de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-12) em níveis semelhantes aos detectados nos animais somente desafiados e não tratados, embora em alguns grupos imunizados com diferentes concentrações do peptídeo houve um aumento parcial na produção dessas citocinas, um indicativo do padrão Th1 de resposta imune. Com relação às citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10), associadas ao padrão Th2 de resposta imune, foram observados níveis elevados nos animais que receberam a formulação vacinal com as diferentes concentrações do peptídeo (figura 6). O cálculo das razões entre citocinas pro e anti-inflamatórias (IL-12/IL-4, IL12/IL-10 ou IFN- γ /IL-4 IFN- γ /IL-10) também não revelou diferenças significativas entre os grupos submetidos ao tratamento com a vacina e os grupos controle (figura 7). Esses resultados indicam que a formulação vacinal testada não foi capaz de modular o sistema imune para o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1, como foi observado nos animais que receberam P10+CFA.

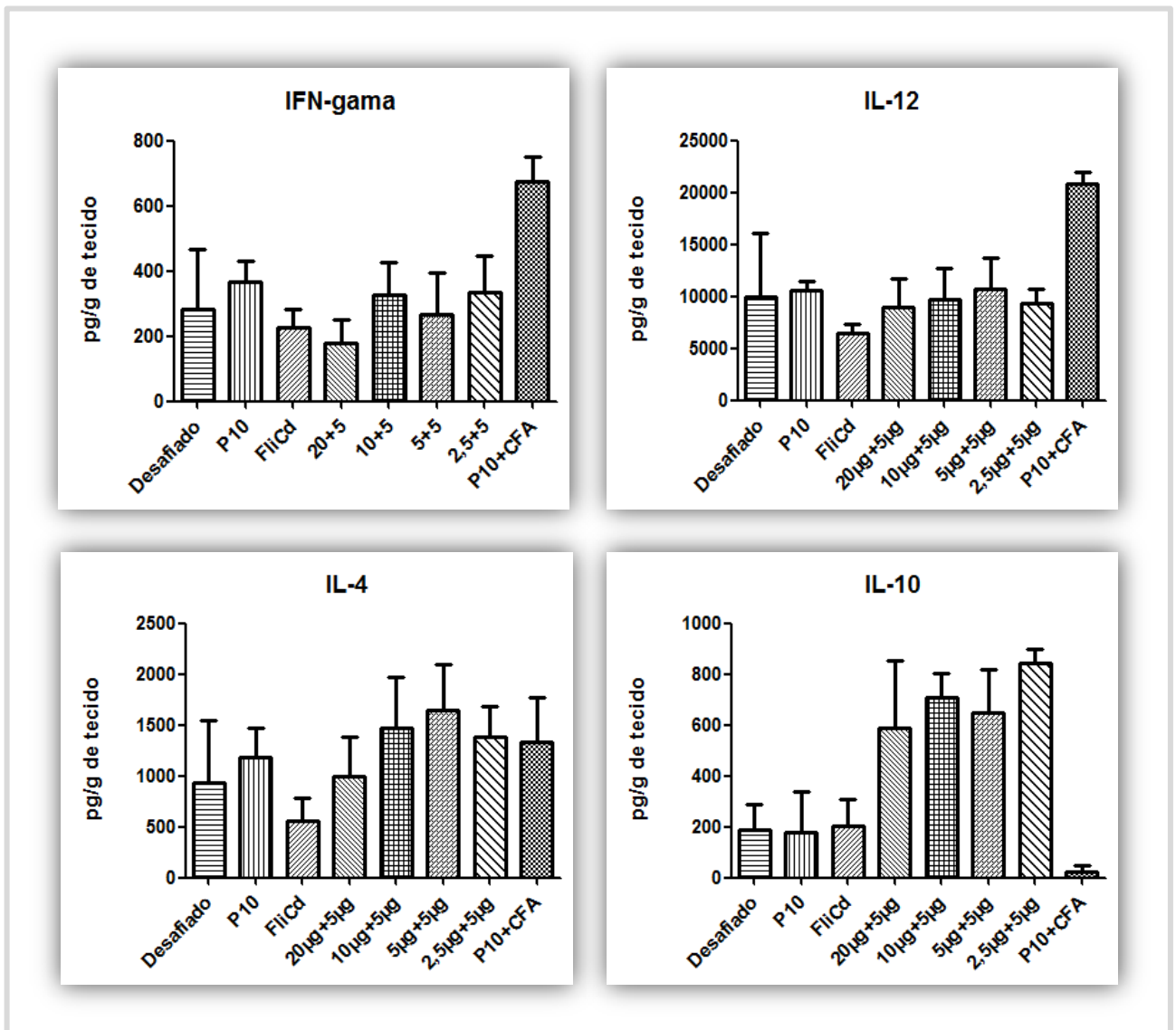


Figura 6 - Produção de citocinas em animais submetidos ao tratamento vacinal terapêutico contra a infecção por *P. brasiliensis*. Respostas obtidas com sobrenadante de cultivo de células de pulmão de animais submetidos ao tratamento vacinal com três doses do peptídeo P10 em diferentes concentrações (20, 10, 5 e 2,5 µg) coadministrado por via i.n. com 5µg de FliCd. O padrão da expressão das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10 no tecido pulmonar foram determinados noventa dias após a infecção por via intratraqueal com 3×10^5 leveduras da linhagem Pb18 de *P. brasiliensis*. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo infectado e não tratado (desafiado). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

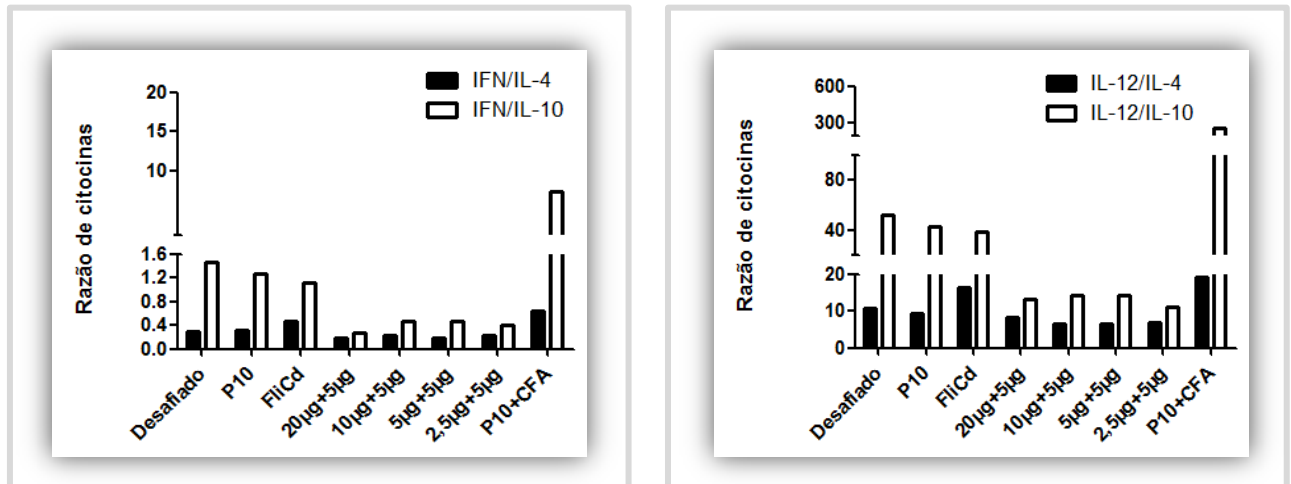


Figura 7 - Produção de citocinas em animais submetidos ao tratamento vacinal terapêutico contra a infecção por *P. brasiliensis*. Razão entre citocinas pró e anti-inflamatórias detectadas em sobrenadante de cultura de células de pulmão de animais infectados e submetidos ao regime vacinal usando diferentes concentrações do peptídeo P10 coadministrado a 5µg de FliCd.

Para aferirmos o potencial terapêutico da formulação vacinal baseada em três doses do peptídeo P10 e FliCd administrado pela via i.n. foram feitas análises histológicas de tecido pulmonar dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. Observa-se na figura 8 painel A pulmões de um animal não infectado onde se observa o parênquima pulmonar preservado. Os pulmões dos animais não tratados, assim como os pulmões de animais infectados e que receberam somente flagelina, apresentaram parênquima pulmonar comprometido e com granulomas contendo muitas células fúngicas em seu interior (painel B e C respectivamente). Os animais tratados com P10+CFA apresentaram uma estrutura alveolar mais preservada e granulomas bem delimitados com poucas células fúngicas (painel D). Os pulmões dos animais tratados com 20 µg ou 2,5 µg de P10 associado à flagelina apresentaram um parênquima menos afetado em relação aos animais somente infectados e não tratados, com granulomas bem delimitados embora com presença de células fúngicas (painel E e F, respectivamente). Nos animais que receberam 10 µg ou 5 µg de P10 associado à flagelina observa-se um parênquima pulmonar semelhante ao parênquima dos animais somente infectados (painel G e H respectivamente).

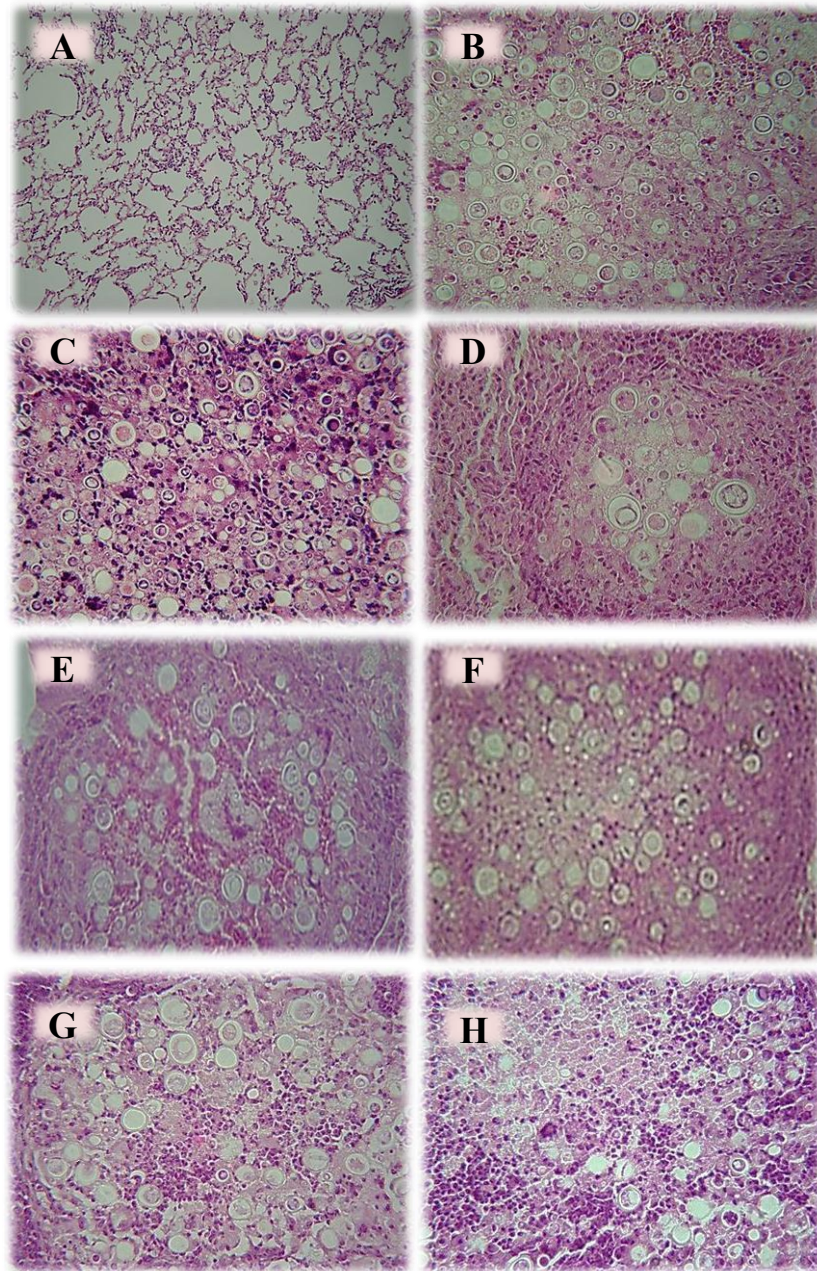


Figura 8 - Histopatologia representativa de lesões no tecido pulmonar de animais submetidos aos tratamentos vacinais terapêuticos contra a infecção por *P. brasiliensis*. Os animais foram infectados por via i.t com 3×10^5 leveduras de Pb18 e após trinta dias submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de P10 (20,10,5 e 2,5 μg) e 5 μg de FliCd. O sacrifício dos animais ocorreu após noventa dias de infecção. Painéis: A. Animais não infectados. B. Animais somente desafiados e imunizados com PBS. C. Animais infectados e tratados somente com FliCd. D. Animais infectados e tratados com P10 emulsificado em CFA. Animais infectados e tratados com a formulação vacinal: E. 20 μg do peptídeo P10 e 5 μg de FliCd . F. 2,5 μg do peptídeo P10 e 5 μg de FliCd. G. 10 μg do peptídeo P10 e 5 μg de FliCd e H. 5 μg do peptídeo P10 e 5 μg de FliCd.

4.4 Definição do intervalo e número de doses empregados na imunização com o peptídeo P10 e FliCd

Na tentativa de se obter uma resposta imune mais eficiente, testamos um esquema de imunização com três, quatro e cinco doses da formulação vacinal baseada no peptídeo P10 (2,5 µg) e FliCd (5 µg) administrada por via i.n em intervalos de uma semana. Após trinta dias da última dose os animais foram sacrificados e as contagens das UFC foram realizadas no baço, fígado e pulmão dos animais para determinarmos a eficácia do tratamento. Os resultados mostram que os animais imunizados com três e quatro doses da formulação vacinal apresentaram uma redução parcial da carga fúngica no pulmão, de quatro e três vezes, respectivamente, em relação aos animais somente desafiados e não tratados. O contrário foi observado nos animais que receberam cinco doses da vacina, tanto os animais somente infectados quanto os animais que receberam a vacina apresentaram níveis semelhantes de UFCs.

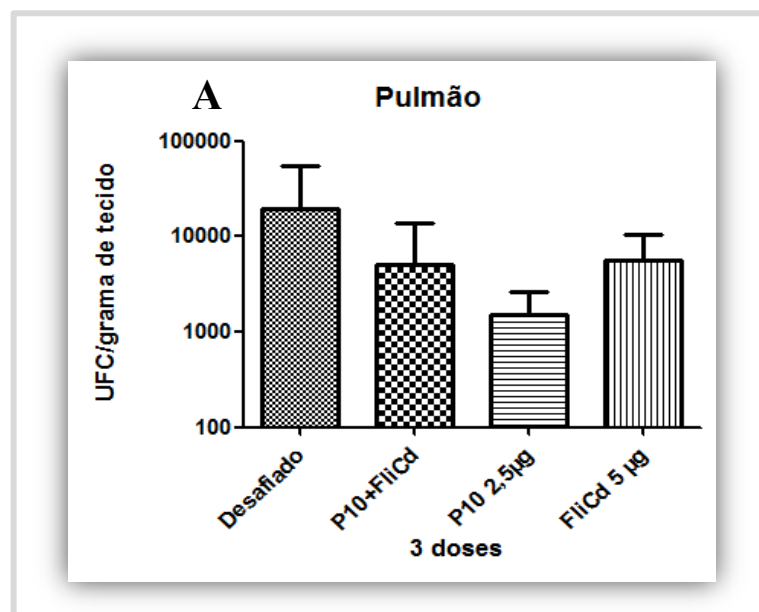


Figura 9 - Efeito do número de doses da formulação vacinal baseada no peptídeo P10 e FliCd sobre a infecção com a linhagem Pb18 de *P. brasiliensis*. Contagem de UFCs no pulmão de animais infectados e submetidos ao tratamento vacinal terapêutico com diferentes números de doses administradas em intervalos de uma semana. Detecção da carga fúngica recuperada de pulmões de animais que receberam três (A), quatro doses (B) e cinco doses (C) da formulação vacinal. Os animais foram infectados por via i.t. com 3×10^5 leveduras da linhagem Pb18 e após 30 dias de infecção os animais receberam 3,4 e 5 doses do peptídeo P10 (2,5 µg) coadministrado com FliCd (5 µg). Grupos controles foram imunizados com PBS estéril (animal somente desafiado), 5 µg de FliCd e 2,5 µg de P10 apenas. Todos os grupos de animais foram sacrificados noventa dias após a infecção. Não houve diferença significativa quando o grupo desafiado somente foi comparado com os grupos imunizados. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

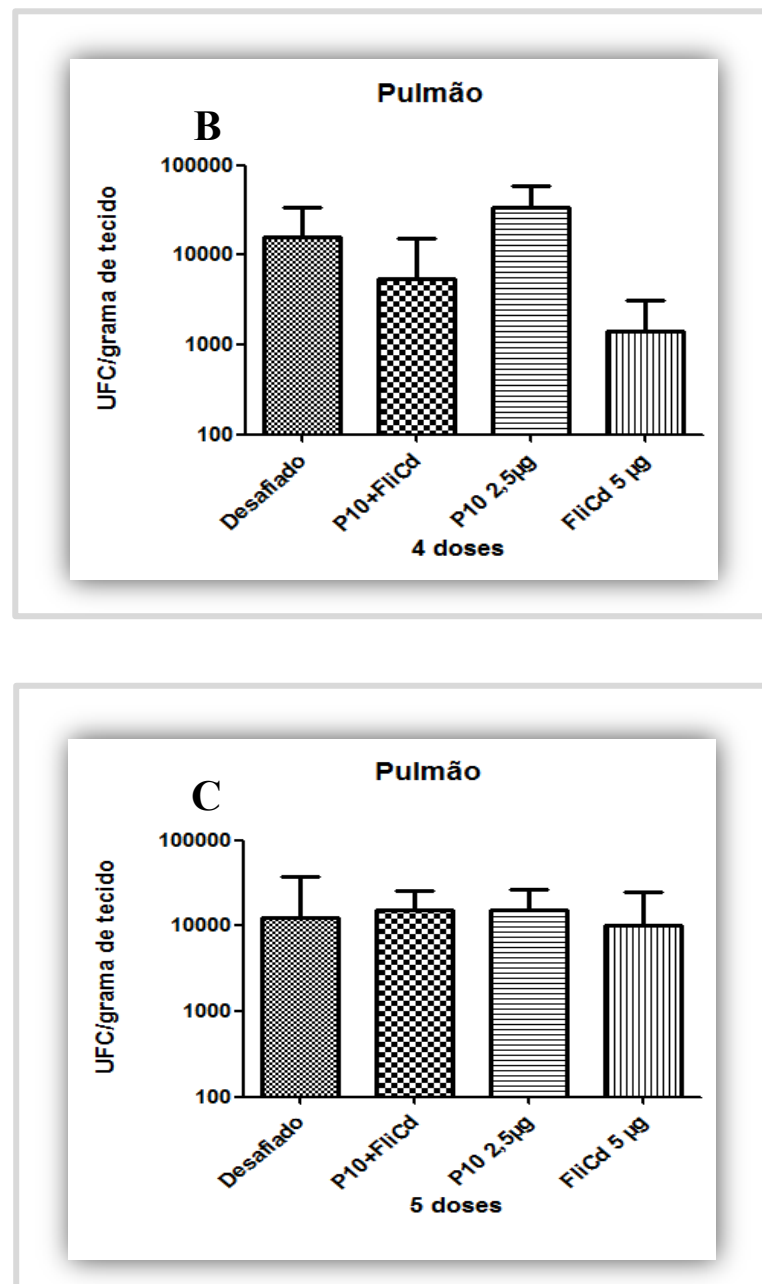


Figura 9 - (continuação)

Os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias foram medidos em células pulmonares dos animais submetidos ao tratamento vacinal com diferentes números de doses. Os resultados demonstram que nos animais que receberam três doses tanto as citocinas relacionadas com o padrão protetor da doença (IFN- γ , IL-12) como as citocinas relacionadas com a não proteção (IL-4, IL-10) apresentaram níveis inferiores ao observado nos animais

desafiados e não tratados (figura 10 A). Os animais que receberam quatro doses da formulação vacinal produziram níveis elevados de IFN- γ e apresentaram uma redução nos níveis de citocinas anti-inflamatórias. Porém esse quadro não foi suficiente para eliminar a carga fúngica no pulmão já que os níveis de UFCs nos animais que receberam quatro doses foram similares aos animais que receberam três doses da formulação vacinal (figura 10 B). Em relação aos animais que receberam cinco doses (figura 10 C), os níveis de citocinas foram similares aos grupos imunizados com 3 e 4 doses com exceção de IL4 que mostrou-se mais elevado nesse grupo.

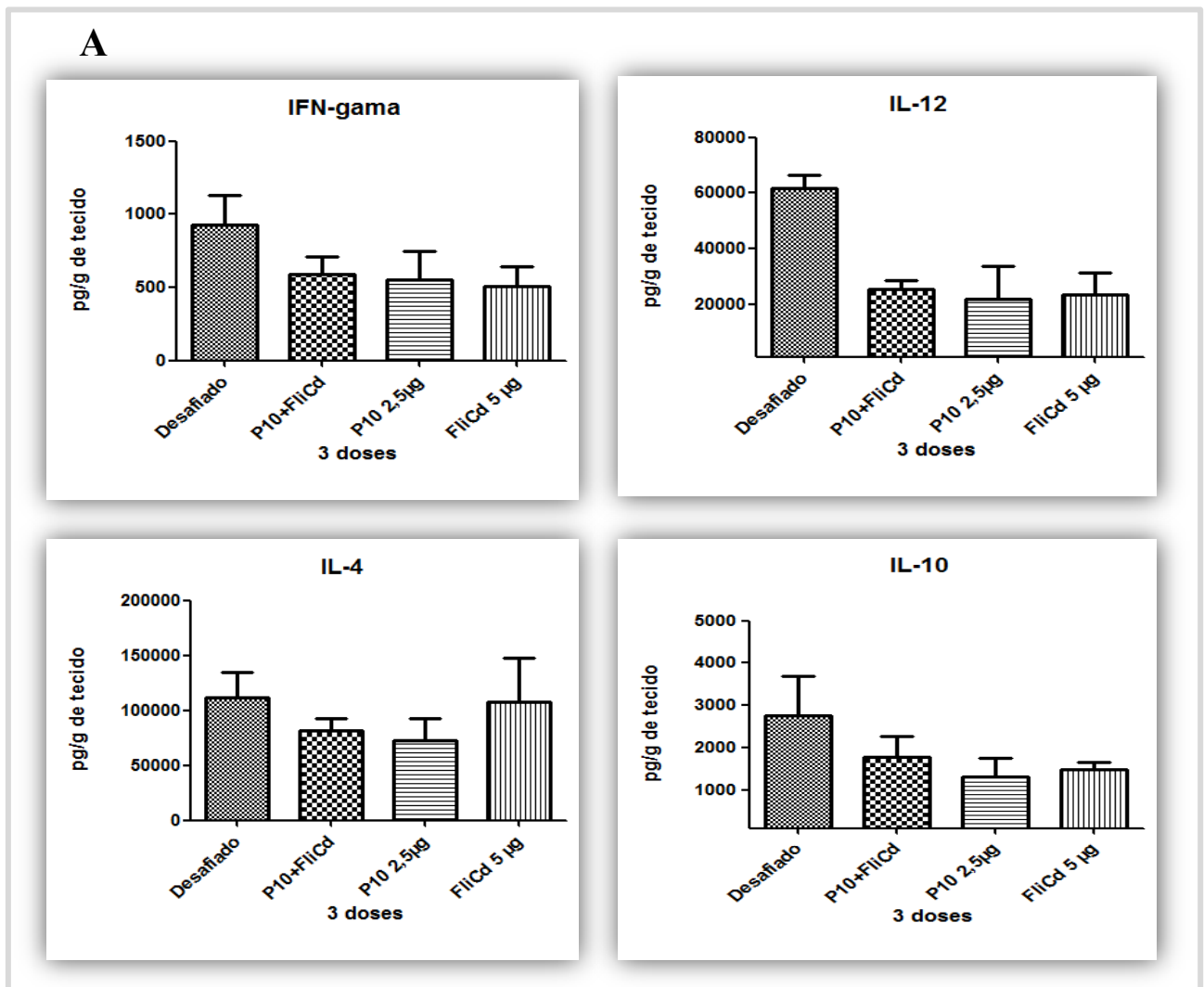


Figura 10 - Produção de citocinas em tecido pulmonar de animais submetidos ao tratamento vacinal terapêutico contendo diferentes números de doses. Respostas obtidas com sobrenadante de cultivo de células de pulmão de animais submetidos ao tratamento vacinal com três (A) quatro doses (B) e cinco doses (C) do peptídeo P10 coadministrado por via i.n. com 5µg de FliCd. O padrão da expressão das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10 no tecido pulmonar foram determinados noventa dias após a infecção com a linhagem Pb18. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo infectado e não tratado (desafiado). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

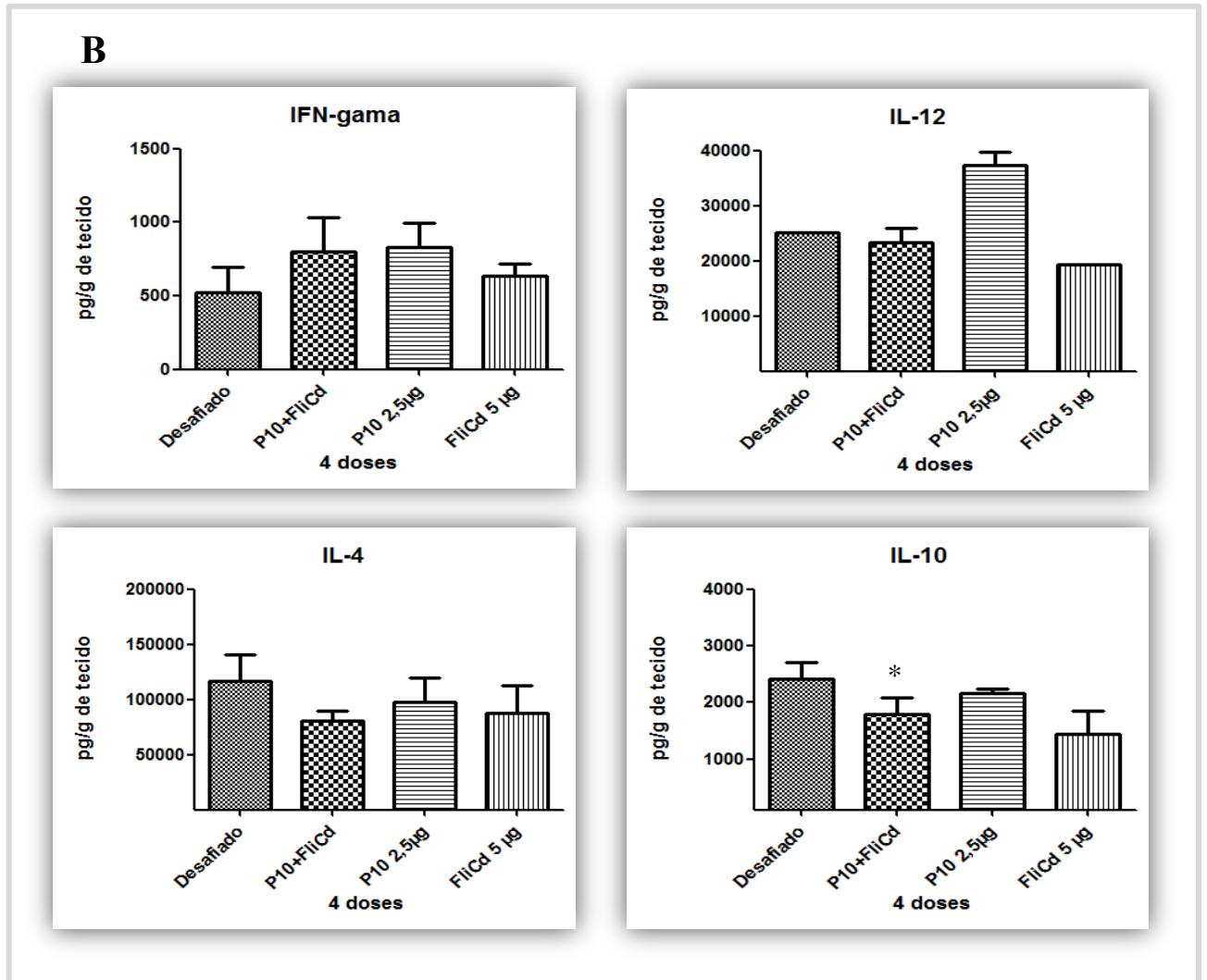


Figura 10 - (continuação)

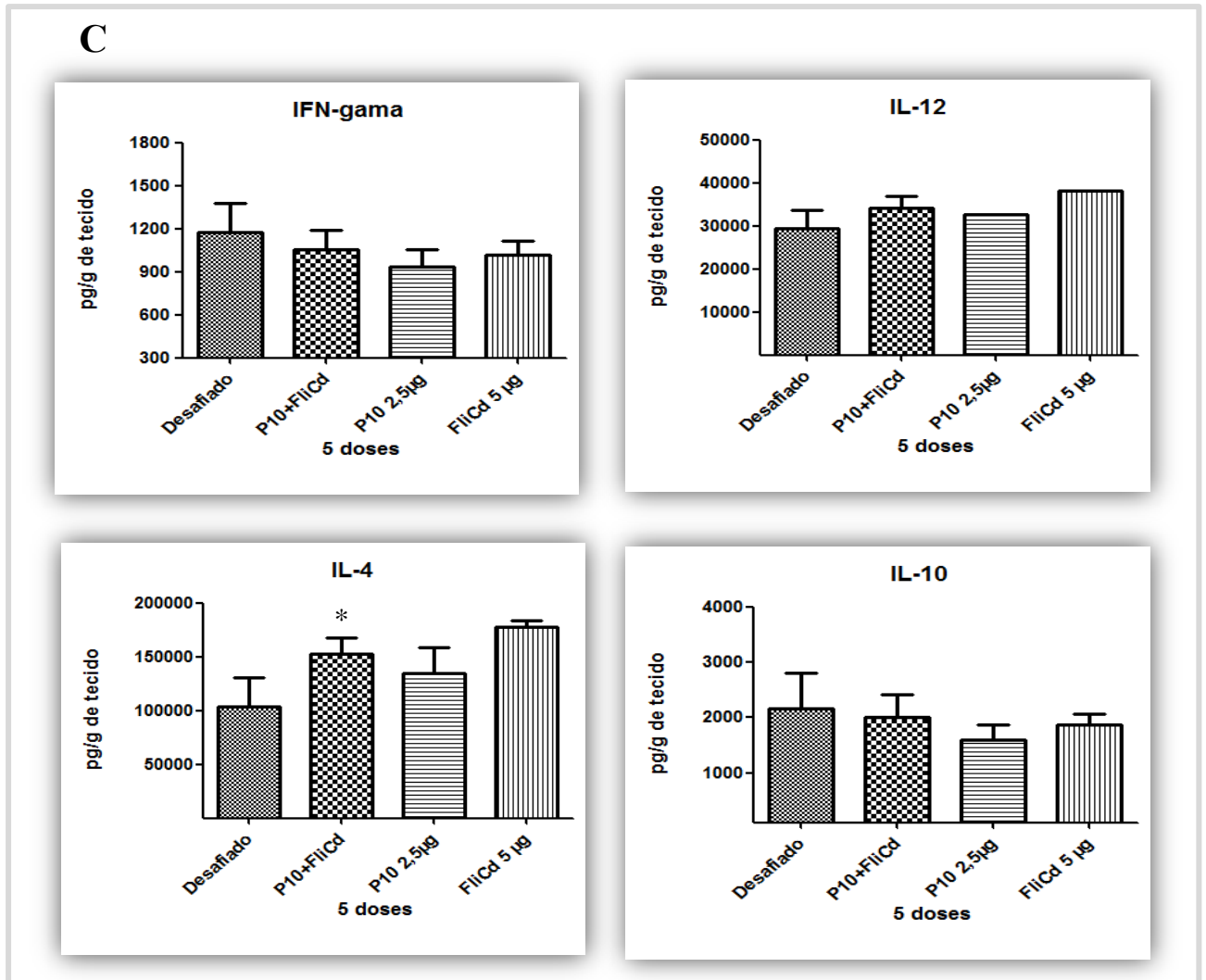


Figura 10 - (continuação)

4.5 Definição de um regime vacinal e avaliação das propriedades terapêuticas anti-Pb após administração por diferentes vias

Avaliamos o potencial terapêutico da formulação vacinal P10 (20 µg) e FliCd (5 µg) quando administrada pela via s.c. em relação à administração pela via i.n. e empregando um esquema com quatro doses da vacina (figura 11). Os resultados apresentados demonstram que os animais que receberam a formulação vacinal pela via i.n. apresentaram uma diminuição parcial da carga fúngica quando comparados com os animais desafiados e não tratados (figura 12 A). Em relação aos animais que foram imunizados pela via s.c. (figura 12 B), não foi observada qualquer proteção em relação aos animais somente infectados e não tratados indicando que a via subcutânea não foi eficiente na montagem de uma resposta protetora capaz de controlar o crescimento fúngico no pulmão.

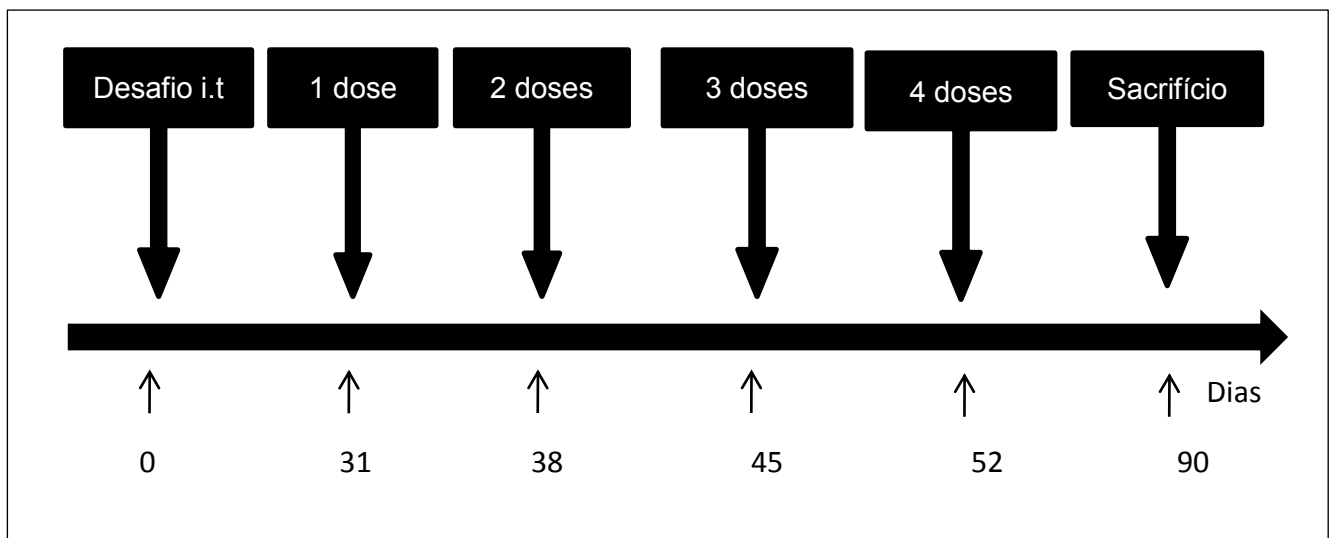


Figura 11 - Regime vacinal empregado para avaliar o efeito terapêutico da formulação P10 e FliCd flagelina administrada pelas vias s.c. ou i.n.. O desafio foi feito com 3×10^5 leveduras da linhagem Pb18 de *P. brasiliensis* pela via i.t. e após 30 dias de infecção os animais receberam 4 doses da vacina por via i.n ou s.c. com intervalo de uma semana. Trinta dias após a última dose os animais foram sacrificados e o número de UFCs, dosagem de citocinas e análises histológicas realizadas com os pulmões dos animais infectados.

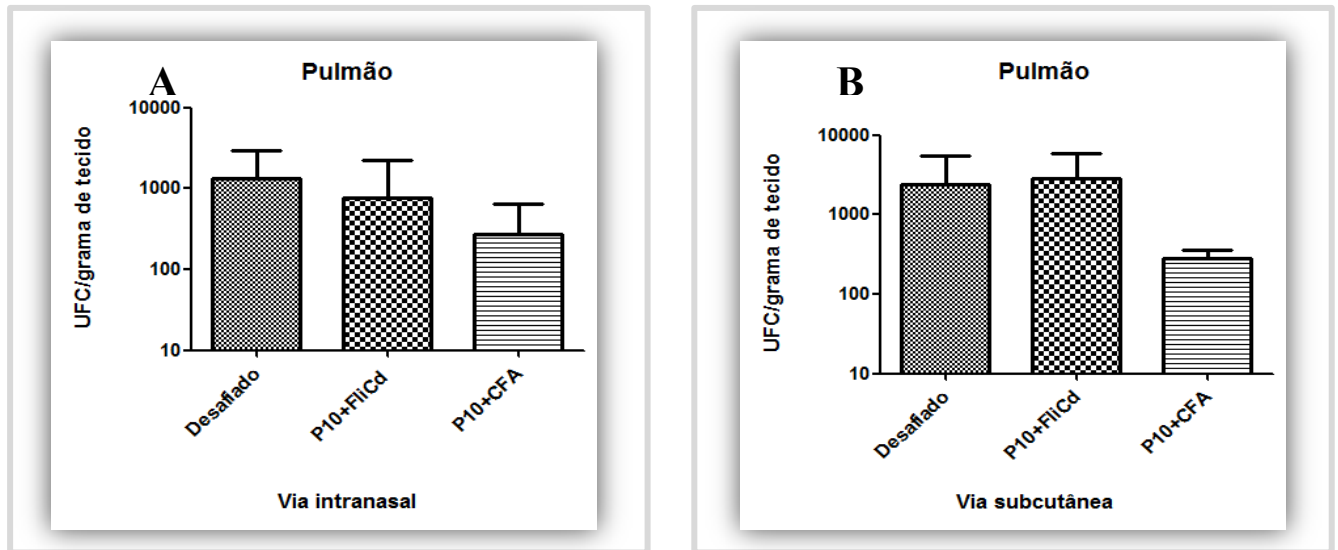


Figura 12 - Efeito da via de administração da vacina baseada no peptídeo P10 e flagelina FliCd sobre a infecção com *P.brasiliensis*. Valores obtidos para contagem de UFCs no pulmão de animais infectados e submetidos ao tratamento vacinal pelas vias i.n. (A) ou s.c. (B). Detecção da carga fúngica recuperada no pulmão de animais infectados por via i.t. com 3×10^5 leveduras da linhagem Pb18 de *P. brasiliensis*. Trinta dias após a infecção os animais receberam 4 doses da formulação vacinal P10+FliCd com intervalo de uma semana. Grupos controles foram tratados com PBS estéril (desafiado). Um grupo controle foi imunizado com 4 doses do peptídeo P10 (20 µg) emulsificado em CFA (1ª dose), administrado por via coxim plantar, e mais 3 doses subsequentes com IFA na proporção 1:1 (vol/vol) por via subcutânea. Todos os grupos de animais foram sacrificados depois de noventa dias de infecção. Não houve diferença significativa quando o grupo desafiado somente foi comparado com os grupos imunizados. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias também foram medidos em células pulmonares dos animais imunizados pelas vias i.n. ou s.c. (figura 13 A e B respectivamente) com quatro doses da vacina. Em relação às citocinas IL-4 e IL-10, o grupo de animais imunizados pela via i.n. apresentou níveis menores em relação aos animais não tratados. Nos animais que receberam a vacina por via s.c. observa-se um aumento na secreção de IL-4 quando comparados com os animais que receberam a formulação por via i.n., porém o mesmo não foi observado em relação à citocina IL-10. Como observado no regime vacinal anterior, a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias não demonstra um padrão polarizado de resposta imune capaz de controlar a infecção.

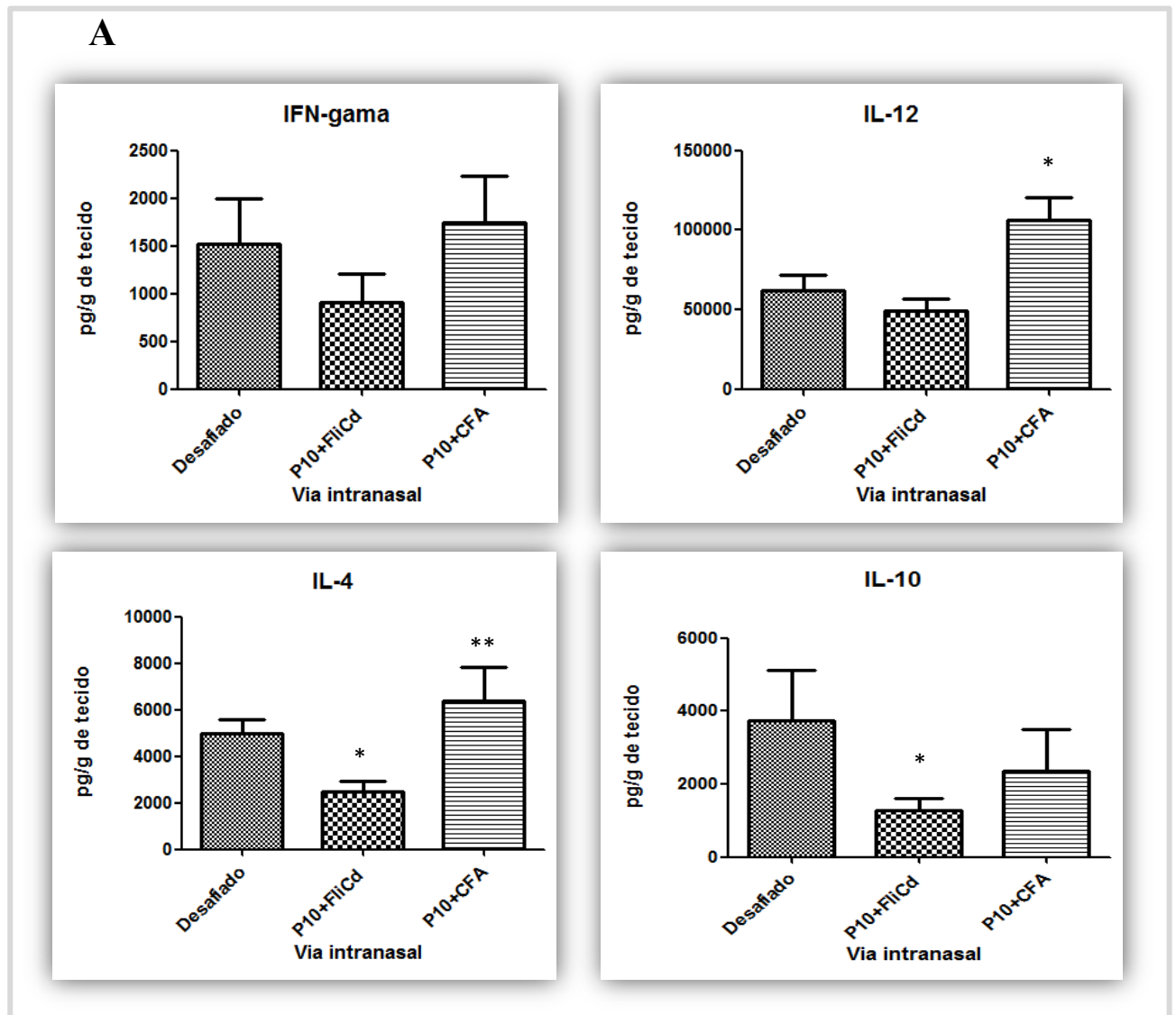


Figura 13 - Produção de citocinas em animais submetidos ao tratamento vacinal de quatro doses administrado pelas vias i.n. ou s.c.. Respostas obtidas com sobrenadante de cultivo de células de pulmão de animais submetidos ao tratamento vacinal baseado em quatro doses do peptídeo P10 (20 µg) co-administrado por via i.n.(A) ou s.c. (B) com 5µg de FliCd. O padrão da expressão das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10 no tecido pulmonar foram determinados noventa dias após a infecção pela via i.t. com Pb18. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo infectado e não tratado (desafiado). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

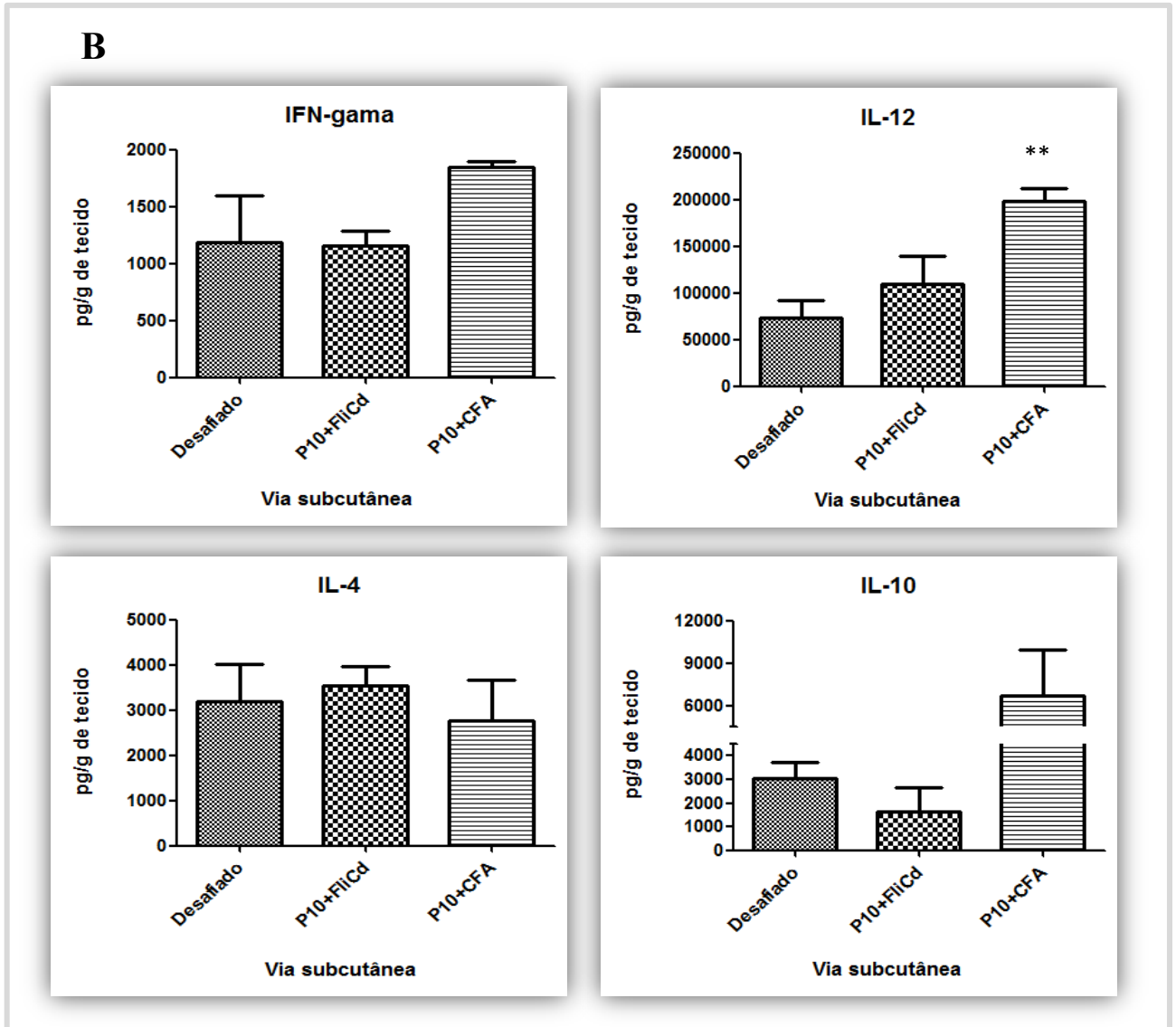


Figura 13 - (continuação)

As análises histológicas de tecido pulmonar foram feitas também em amostras de pulmão de animais tratados com quatro doses da formulação vacinal administrada por via i.n. ou s.c. Os animais que foram somente infectados e não tratados apresentaram granulomas desorganizados contendo muitas células fúngicas em seu interior (painel A). Em relação aos animais que foram tratados com a formulação vacinal contendo 20 µg de P10 e 5 µg de FliCd administrada tanto pela via i.n (painel B) como pela via s. c (painel C) apresentaram um comprometimento pulmonar, apesar disso, os granulomas estavam mais organizados embora contendo muitas células fúngicas e inflamação.

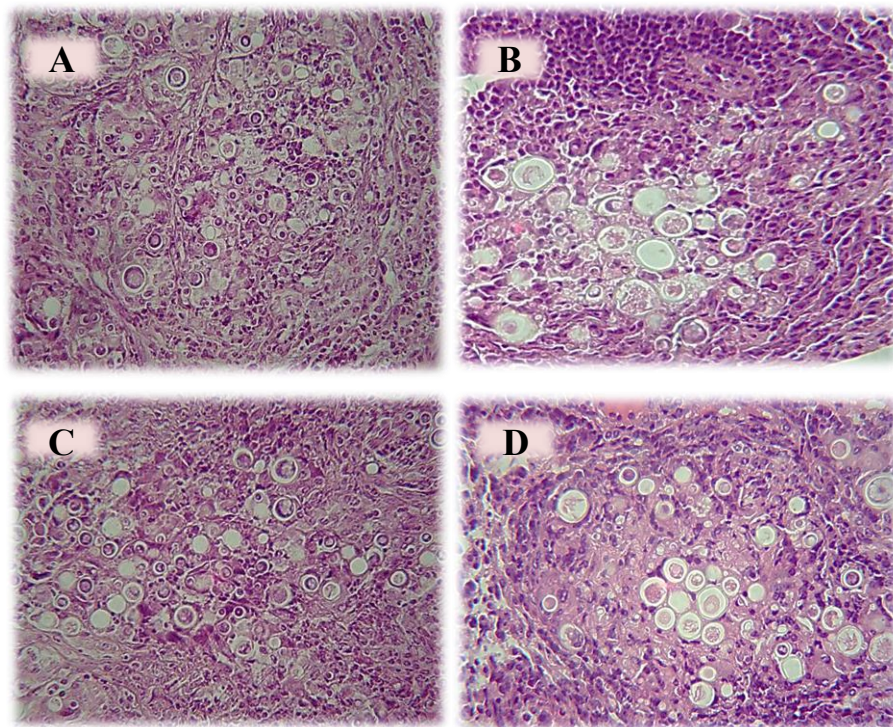


Figura 14 - Histopatologia representativa de lesões no tecido pulmonar de animais submetidos ao tratamento vacinal de quatro doses administradas pelas vias i.n. ou s.c. após infecção por *P. brasiliensis*. Os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras de Pb18 e após trinta dias submetidos ao tratamento com 20 µg de P10 e 5 µg de FliCd. O sacrifício dos animais ocorreu após noventa dias de infecção. Painéis: A. Animal somente desafiado e imunizado com PBS. B. Animal infectado e imunizado pela via i.n.. C. Animal infectado e imunizado pela via s.c.. D. Animal infectado e tratado com P10 emulsificado em CFA.

4.6 Associação do tratamento vacinal baseado no peptídeo P10 e FliCd com a quimioterapia específica para a PCM

Como última etapa do trabalho realizado, avaliamos o possível efeito sinérgico entre a imunização com o peptídeo P10 combinado com FliCd e a quimioterapia específica para a PCM. Para avaliarmos o efeito da formulação vacinal combinada ao tratamento com quimioterápico frente à infecção por *P. brasiliensis* escolhemos o regime vacinal baseado em quatro doses da formulação vacinal do peptídeo P10 (20 µg) e FliCd (5 µg) administrados com intervalo de uma semana. A escolha deste regime foi determinado pelos testes realizados com 3,4 e 5 números de doses da vacina associado aos dados encontrados na literatura que utilizam essa estratégia vacinal em abordagens terapêuticas. Assim os animais infectados com a linhagem Pb18 receberam, trinta dias após a infecção, pela via i.n. ou s.c.. a formulação vacinal P10 e FliCd. Durante os trinta dias de tratamento com a vacina os animais receberam por via i.p. o tratamento diário baseado em sulfametoxazol/trimetropim (0,45 mg/animal). Os resultados obtidos mostraram que animais imunizados pela via i.n. , seja em combinação ou não com a quimioterapia, apresentaram redução na carga fúngica no pulmão quando comparados com os animais desafiados e não tratados. No entanto, não foi observado um efeito protetor sinérgico ou aditivo quando associou-se o tratamento quimioterápico com a formulação vacinal. De fato, o grupo de animais submetido ao tratamento combinado apresentou um número maior de leveduras no pulmão do que os animais somente imunizados com a formulação. Além disso, os animais que receberam apenas P10 e FliCd não apresentaram disseminação do fungo para o baço e fígado, ao contrário dos animais que receberam a vacina em associação ao antifúngico (figura 15).

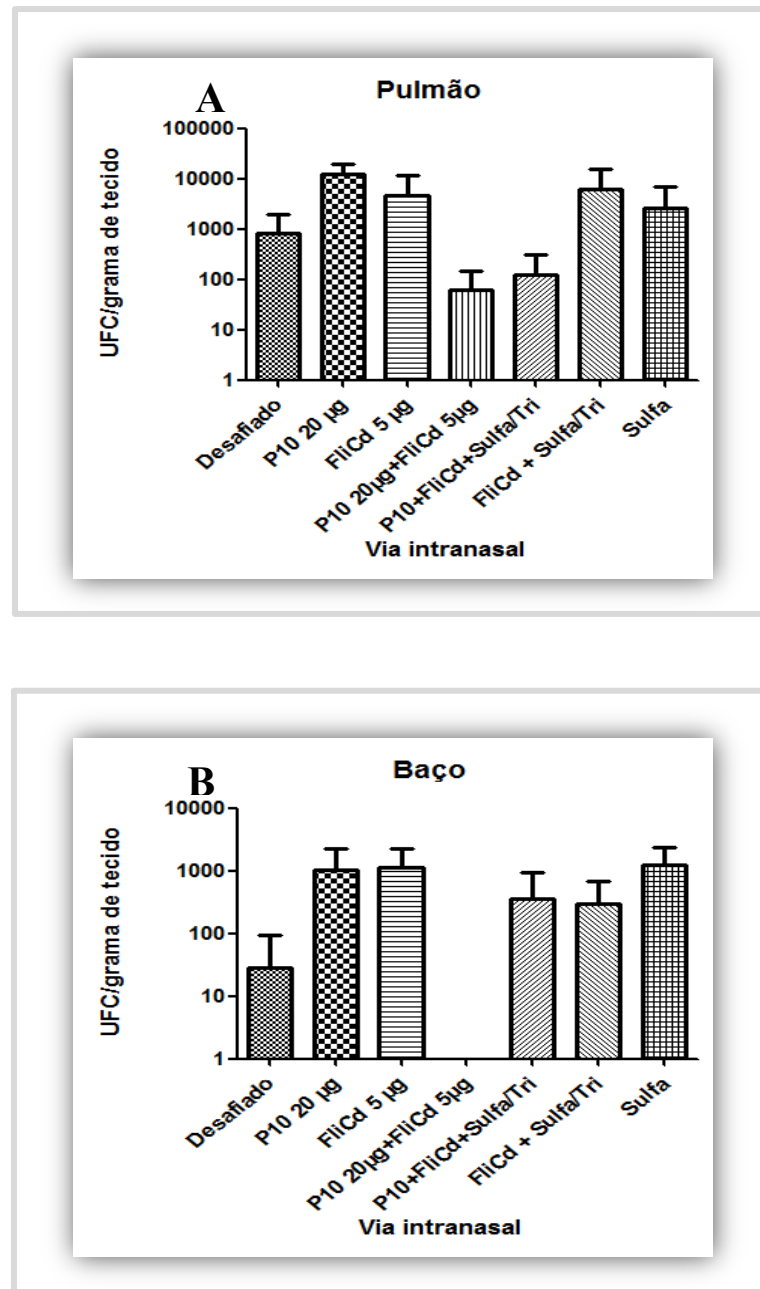


Figura 15 - Efeito da combinação do tratamento vacinal administrado por via i.n com o tratamento quimioterápico na infecção experimental com *Pb*. Contagem de UFCs em diferentes órgãos de animais infectados e submetidos ao tratamento vacinal combinado ao tratamento quimioterápico. Detecção da carga fúngica recuperada no pulmão (A), baço (B) e fígado (C) de animais infectados por via i.t. com 3×10^5 leveduras da linhagem *Pb18* e imunizados com quatro doses da formulação vacinal P10+FliCd associado ou não a Sulfametoxazol/trimetropim pela via i.n. Grupos controles foram imunizados com PBS estéril (desafiado), 5 µg de flagelina, 20 µg de P10 e Sulfametoxazol/trimetropim apenas. Todos os grupos de animais foram sacrificados depois de noventa dias de infecção. Não houve diferença significativa quando o grupo desafiado somente foi comparado com os grupos imunizados. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

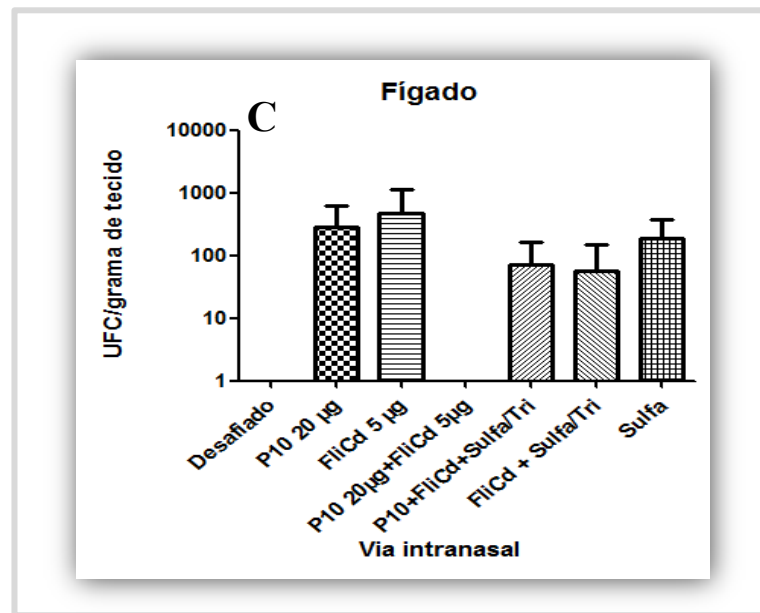


Figura 15 - (continuação)

Os animais que receberam a formulação vacinal pela via s.c. apresentaram quantidades similares de leveduras no pulmão quando comparados com os animais somente infectados. Já os animais que foram imunizados e tratados com sulfametoxazol/trimetropim mostraram uma redução parcial no número de UFCs (figura 16). Os dois grupos não controlaram a disseminação do fungo para o baço e fígado. Os resultados encontrados sugerem que a flagelina utilizada como adjuvante pela via s.c. não foi capaz de modular o sistema imunológico dos animais infectados com Pb18 e montar uma resposta capaz de controlar o crescimento fúngico no pulmão.

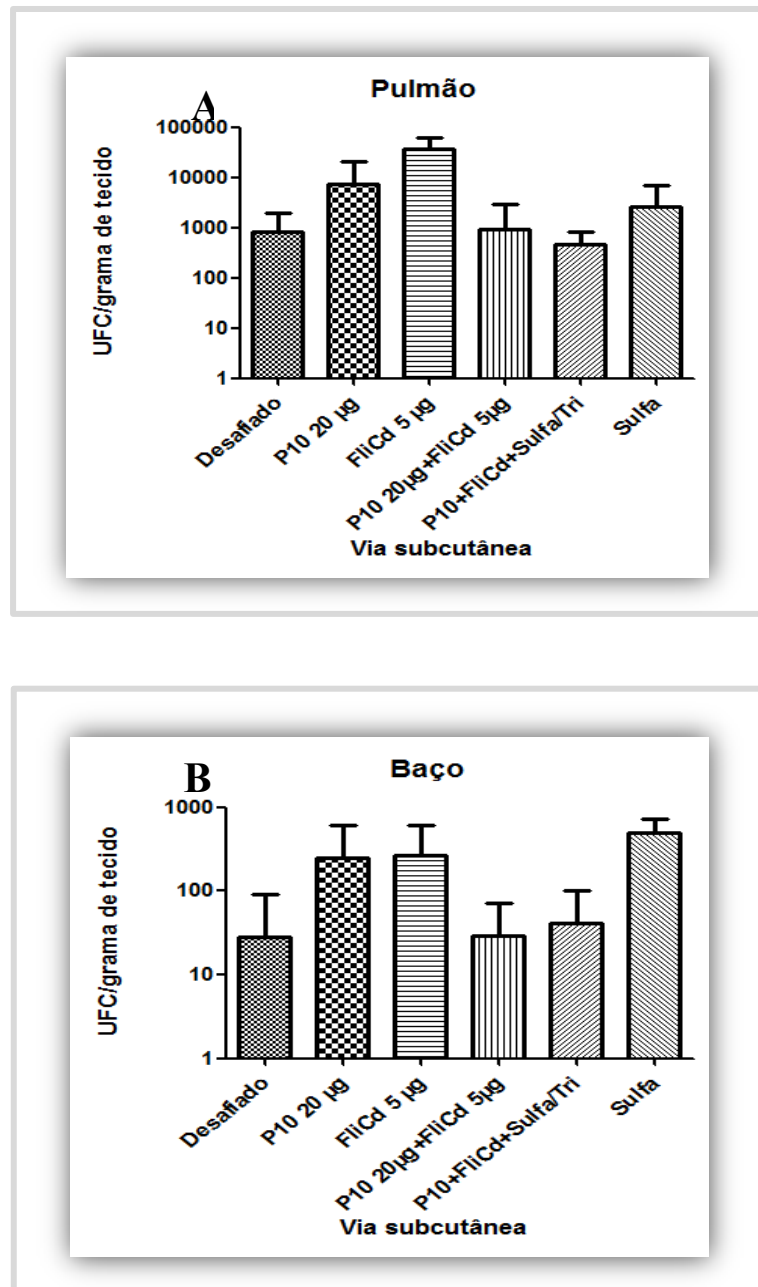


Figura 16 - Efeito da combinação do tratamento vacinal administrado por via s.c com o tratamento quimioterápico na infecção experimental com *Pb* . Contagem de UFCs em diferentes órgãos de animais infectados e submetidos ao tratamento vacinal combinado ao tratamento quimioterápico. Detecção da carga fúngica recuperada no pulmão (A), baço (B) e fígado (C) de animais infectados por via i.t. com 3×10^5 leveduras da linhagem *Pb18* e imunizados com quatro doses da formulação vacinal P10+FliCd associado ou não a Sulfametoxazol/trimetropim pela via s.c. . Grupos controles foram tratados com PBS estéril (desafiado), 5 µg de flagelina, 20 µg de P10 e Sulfametoxazol/trimetropim . Todos os grupos de animais foram sacrificados depois de noventa dias de infecção. Não houve diferença significativa quando o grupo desafiado somente foi comparado com os grupos imunizados. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

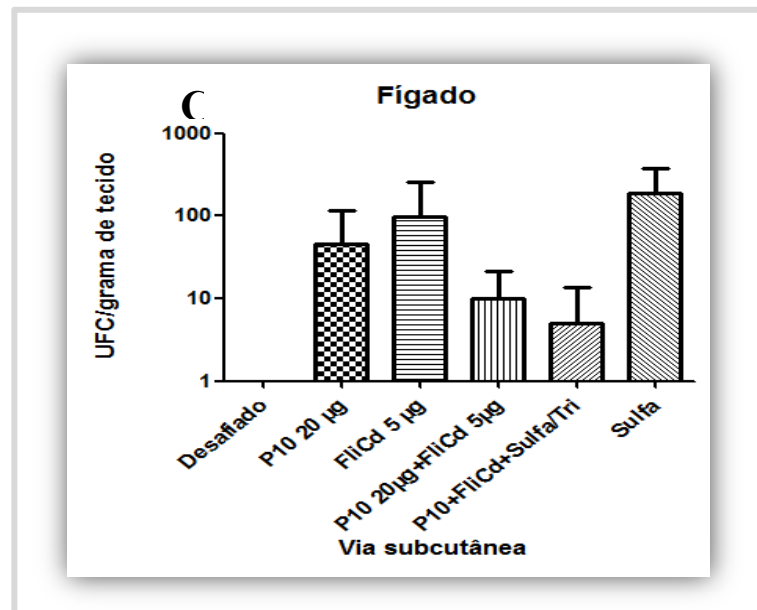


Figura 16 - (continuação)

Os animais submetidos ao regime vacinal combinado ao tratamento com quimioterápicos apresentaram níveis de citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ e IL-12, menores do que aqueles encontrados nos animais desafiados e não tratados, independente da via de administração. Em relação às citocinas anti-inflamatórias, os animais que receberam a formulação vacinal, tanto pela via nasal como pela via s.c., apresentaram aumento nos níveis de IL-4. No entanto, esse aumento não foi observado nos animais que receberam FliCd e P10 separadamente. Níveis similares de IL-10 foram produzidos pelos animais que receberam a formulação vacinal pela via i.n. combinada ou não ao sulfametoxazol/trimetropim. Nos animais imunizados pela via s.c. observa-se uma redução de IL-10 em relação aos animais não tratados (figura 17).

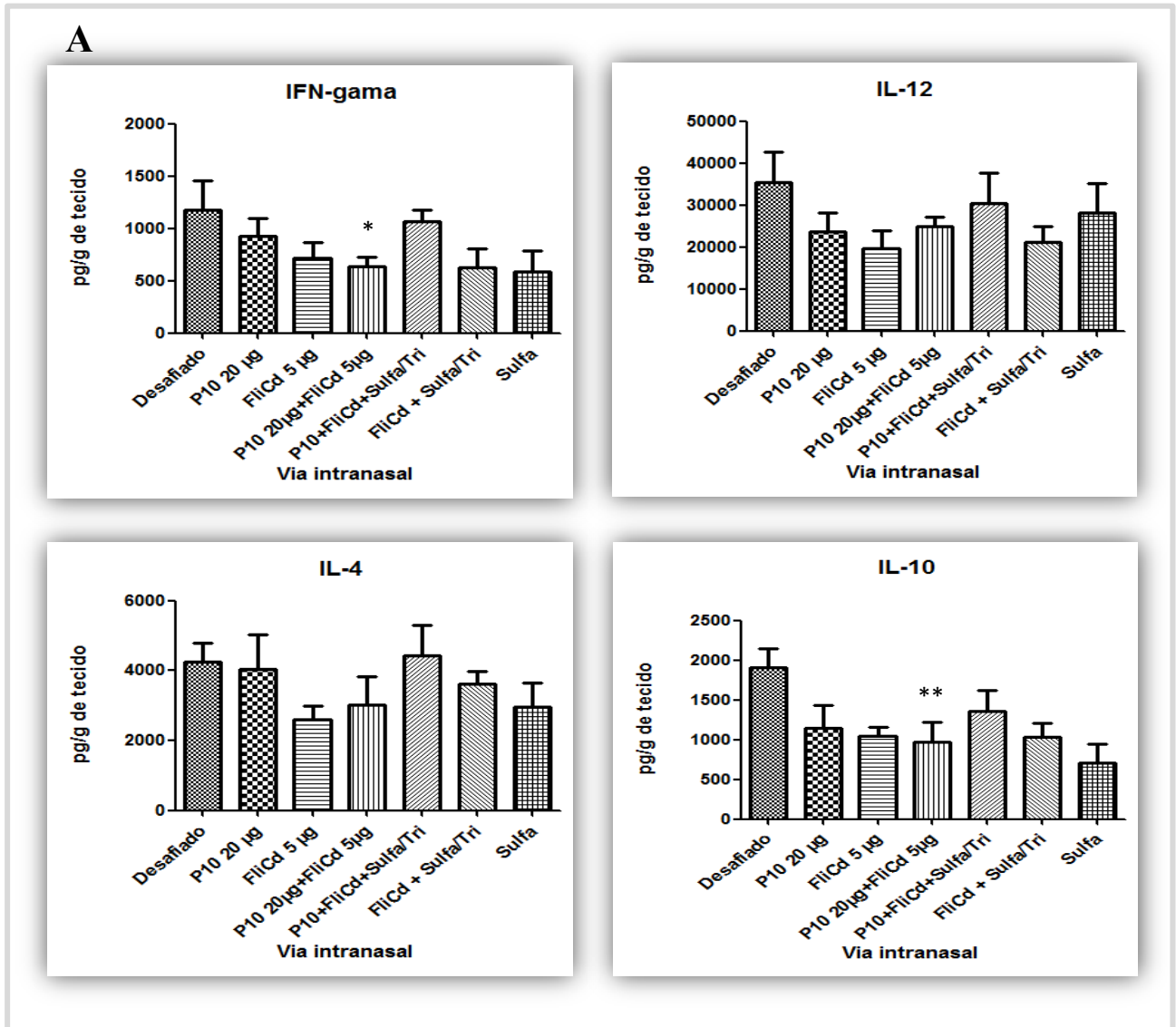


Figura 17 - Produção de citocinas em animais submetidos ao tratamento vacinal terapêutico em associação com a quimioterapia específica para Pb. Dosagem de citocinas no sobrenadante de pulmão de animais infectados e tratados com quatro doses da formulação vacinal P10+FliCd, administrada pela via i.n. (A) ou pela via s.c. (B), associada ao tratamento com sulfametoxazol/trimetropim. Os padrões da expressão das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10 no tecido pulmonar foram determinados noventa dias após a infecção pela via i.t. com a linhagem Pb18. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo infectado e não tratado (desafiado). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

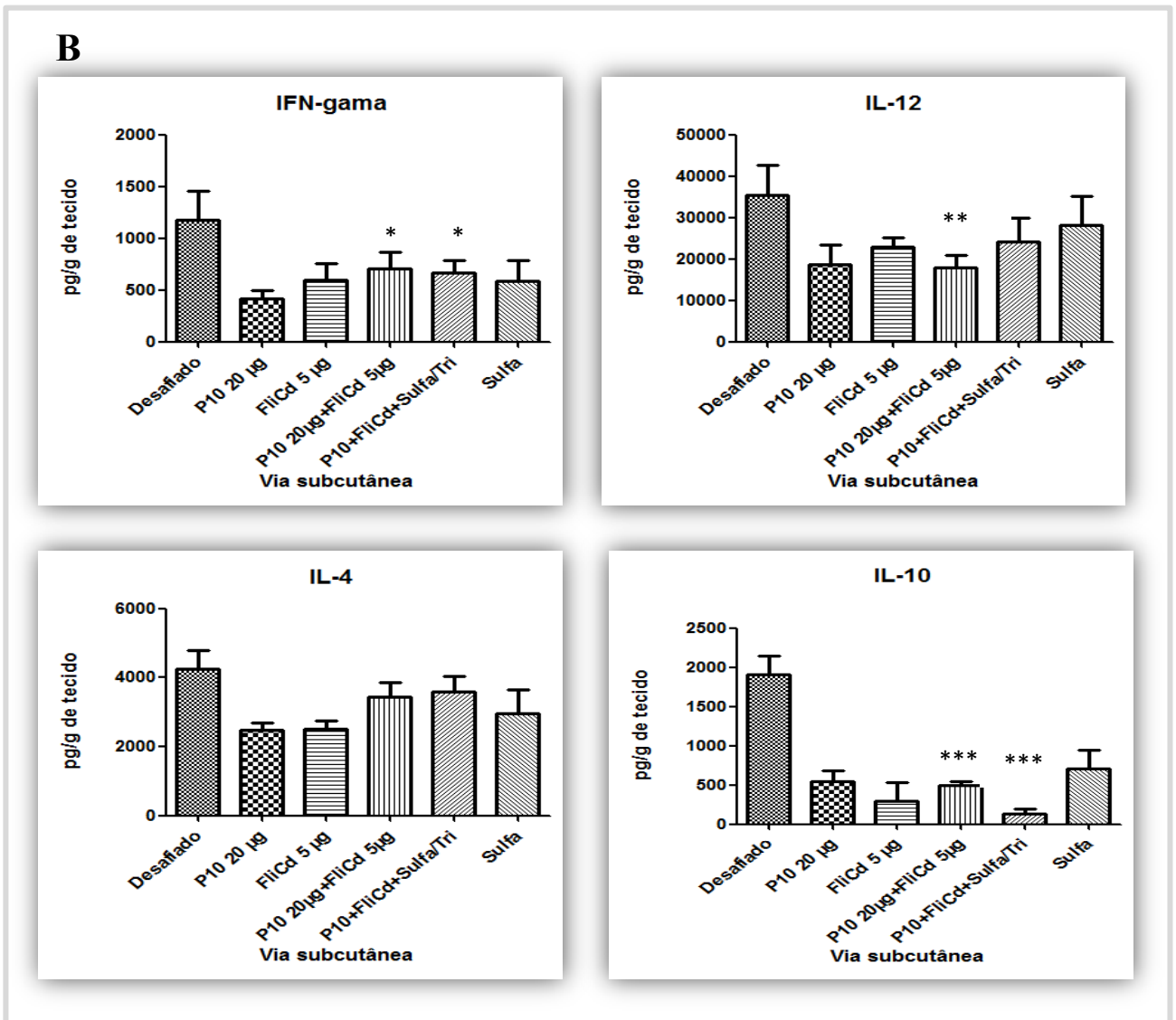


Figura 17 - (continuação)

Por fim, foram feitas análises histológicas de amostras de pulmão dos animais que receberam o tratamento vacinal combinado à quimioterapia. O painel B (figura 18) mostra que animais infectados e não tratados apresentaram lesões granulomatosas com grande comprometimento do tecido pulmonar. A análise histopatológica dos animais que receberam apenas o tratamento quimioterápico mostrou tecidos com estrutura pulmonar mais conservada e granulomas delimitados, mas com grande número de células fúngicas (figura 18, painel J). Os pulmões dos animais que receberam a formulação vacinação, tanto pela via i.n. como pela

via s.c., apresentaram um parênquima pulmonar semelhante aos animais que receberam somente o tratamento com sulfametoxazol/trimetropim, ou seja, os granulomas observados estavam mais organizados embora com muitas células fúngicas, além disso, uma intensa infiltração celular foi notada (figura 18, painéis E e G, respectivamente). Animais que receberam P10 e *FliCd* associado ao sulfametoxazol/trimetropim, apresentaram uma estrutura alveolar com as mesmas características encontradas nos pulmões dos animais que receberam somente o tratamento vacinal, independente da via utilizada (figura 18, painéis F. via i.n e H. via s.c). Os resultados observados nos cortes histológicos dos pulmões dos animais infectados corroboram os resultados de produção de citocinas.

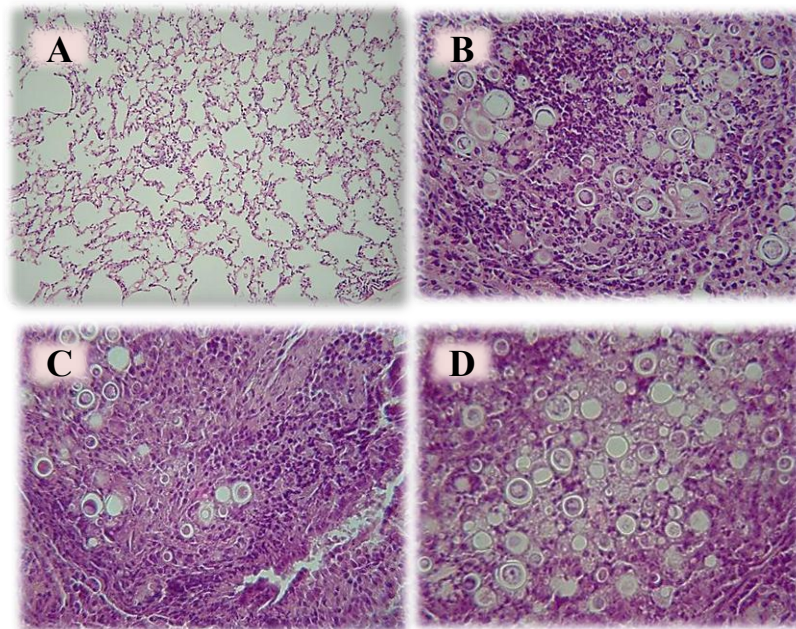


Figura 18 - Histopatologia representativa de lesões no tecido pulmonar de animais submetidos ao tratamento vacinal combinado à quimioterapia. Os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras da linhagem Pb18 e após trinta dias submetidos ao tratamento vacinal pela via i.n ou s.c. com 20 μg de P10 e 5 μg de flagelina *FliCd* associado ou não a sulfametoxazol/trimetropim. O sacrifício dos animais ocorreu após noventa dias de infecção. Painéis: A. Animal não infectado. B. Animal somente infectado. C. Animal imunizado com P10 (i.n.). D. Animal imunizado com *FliCd* (i.n.). E. Animal imunizado com P10+*FliCd* por via i.n. F. Animal imunizado com a formulação P10+*FliCd* (i.n.) associada à sulfametoxazol/trimetropim. G. Animal imunizado com P10+*FliCd* por via s.c. H. Animal imunizado com a formulação P10+*FliCd* (s.c.) associada à sulfametoxazol/trimetropim. I. Animal imunizado com *FliCd* associada à sulfametoxazol/trimetropim. J. Animal tratado somente com sulfametoxazol/trimetropim.

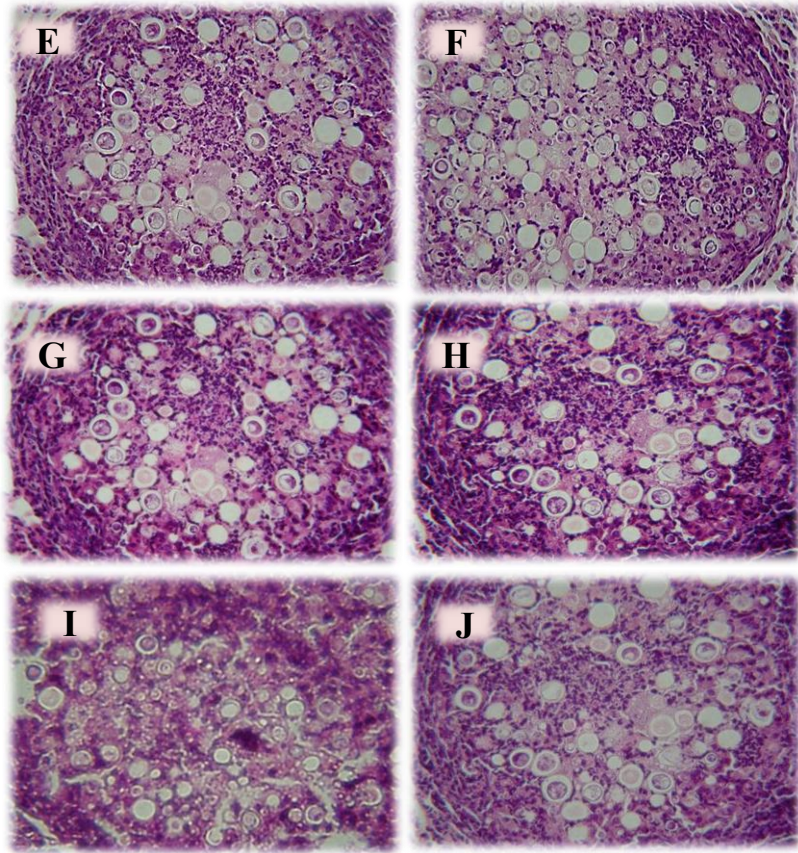


Figura 18 - (continuação)

5 DISCUSSÃO

A PCM representa uma das mais sérias e danosas infecções fúngicas, de caráter sistêmico presente de forma endêmica em grande parte do território brasileiro. Embora existam alternativas quimioterápicas para o tratamento da infecção, fatores como custo elevado, longo tempo de tratamento e efeitos adversos acabam por comprometer a eficácia do tratamento gerando recidivas freqüentes e formas resistentes aos tratamentos disponíveis. No presente trabalho avaliamos a eficiência de uma nova alternativa terapêutica para o controle da PCM experimental. Nessa abordagem, exploramos as características únicas do peptídeo P10, importante alvo vacinal quando combinado a diferentes adjuvantes, e uma flagelina de *Salmonella*, potente ativador do sistema imune inato com ação profilática frente à PCM experimental, como demonstrado em trabalho anterior feito pelo nosso grupo. Os resultados demonstraram que os efeitos terapêuticos do peptídeo P10 combinado à flagelina *FliCd*, administrados por via nasal ou sub-cutânea, embora mensuráveis não atingiram valores tão expressivos como aqueles observados em condições profiláticas. De forma semelhante, a combinação da imunoterapia com quimioterápicos (sufametaxazol/trimetoprim) empregados no tratamento da PCM não foi capaz de revelar um efeito sinérgico substancial frente ao crescimento do patógeno. Embora tais resultados demonstrem uma eficácia terapêutica reduzida da imunoterapia P10 e *FliCd*, as dificuldades experimentais observadas, como a reprodutibilidade dos ensaios de desafio e a aparente falta de atividade dos antibióticos testados, indicam que novas análises devem ser feitas para que possamos confirmar o real potencial terapêutico da estratégia vacinal em condições experimentais.

A definição do projeto de pesquisa que resultou na presente tese de mestrado foi fundamentada em alguns pontos básicos. Em primeiro lugar, resultados obtidos pelo nosso grupo, em conjunto com o grupo liderado pelo Prof. Carlos Taborda, demonstraram de forma contundente que a flagelina (*FliCd*) de *Salmonella* é capaz de atuar como potente imunomodulador quando combinada ao peptídeo P10 de *P.brasiliensis* (BRAGA et al., 2009). Os resultados gerados em condições profiláticas indicaram claramente que, ao contrário do observado após a combinação da flagelina com proteína gp43, a administração por via i.n. da formulação P10 e *FliCd* é capaz de modular o padrão de citocinas secretadas por células do pulmão nos animais tratados. Observa-se uma mudança de um padrão de resposta do tipo Th2 para um padrão do tipo Th1 nos animais que receberam a formulação seja antes do desafio ou, particularmente, após o desafio (BRAGA et al., 2009). Esse padrão de resposta foi atribuído

não apenas a um aumento dos níveis de expressão de IFN- γ e IL-12, mas, e principalmente, à redução na produção de IL-10, uma citocina reconhecida pelos seus efeitos inibitórios sobre a ativação de linfócitos T efetores, sejam eles do tipo CD8⁺ ou CD4⁺ (MOSMANN, 1994, MOREIRA et al., 2010). Em tais condições observamos que a combinação P10 e FliCd foi capaz de reduzir drasticamente a infecção chegando a eliminação do patógeno após um maior tempo de observação (dados não publicados).

Esses resultados demonstraram que a combinação P10 e FliCd representaria uma alternativa profilática particularmente potente frente à PCM experimental e sem paralelo na literatura relacionada levando em consideração à via de administração utilizada. De fato, o interesse no uso de flagelinas de *Salmonella* como adjuvantes para formulações vacinais profiláticas e/ou terapêuticas resultou na elaboração e submissão de pedido de patente, depositado no INPI em 25 de setembro de 2009 no qual apresentamos resultados relativos ao seu uso profilático e previmos a sua utilização em condições terapêuticas (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2009). Nesse contexto, a avaliação das propriedades curativas da formulação P10 e FliCd para o controle da PCM experimental passou a ser um desdobramento lógico e natural ao trabalho que iniciado.

Outro ponto de sustentação da presente tese foi a experiência do laboratório na área de desenvolvimento de adjuvantes. Entre as linhas de pesquisa do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas da USP estão o desenvolvimento e a produção de moléculas de origem microbiana com propriedades imunomoduladoras sobre diferentes aspectos do sistema imunológico, com destaque para os adjuvantes vacinais. Nos últimos anos, foram implantadas inúmeras metodologias que viabilizaram a produção e o uso de derivados não tóxicos de toxinas do grupo LT (toxinas termo-lábeis produzidas por algumas linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênica) e diversas flagelinas bacterianas. Em relação às flagelinas, o laboratório produz atualmente diversas preparações derivadas de duas espécies bacterianas (*Bacillus subtilis* e alguns sorovares de *Salmonella enterica*). Entre as flagelinas de *S. enterica* destacam aquelas produzidas por *S. Typhimurium* (FliCi e FljB) e por *S. Muenchen* (FliCd), cuja composição antigênica é idêntica à flagelina de *S. Typhi*, o agente causador da febre tifóide (BRENNER et al., 2000).

No laboratório foram estabelecidas condições de purificação de formas nativas (extraídas diretamente da linhagem de *Salmonella*) ou recombinantes (produzidas em linhagens de *E. coli* a partir de vetores plasmidiais de expressão nos quais são clonados os respectivos genes codificadores). Para o presente trabalho escolhemos a flagelina FliCd nativa pelo fato desta ter sido empregada no primeiro estudo das propriedades antifúngicas da

formulação (BRAGA et al., 2009). Embora não existam estudos sistemáticos voltados para a comparação das propriedades imunomoduladoras e adjuvantes de diferentes flagelinas, espera-se que os resultados obtidos com outras flagelinas sejam semelhantes aqueles obtidos com a flagelina *FliCd*. De fato, pesquisas iniciais feitas no laboratório indicam que, pelo menos em relação ativação de linfócitos, algumas flagelinas de *Salmonella* mostram efeitos adjuvantes semelhantes (BRAGA et al., 2008). Tal constatação se baseia na conservação de sequências, localizadas nas extremidades da molécula, que estão envolvidas diretamente com as propriedades imunológicas das flagelinas bacterianas (YONEKURA; MAKI-YONEKURA; NAMBA, 2003; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004).

O terceiro e último sustentáculo da presente tese foi a estreita colaboração com a equipe do laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos liderada pelo Prof. Carlos Taborda, reconhecido nacional e internacionalmente pelo seu trabalho em *P.brasiliensis*. A manipulação do fungo e a sua administração em camundongos exigem condições laboratoriais e treinamento técnico especializado necessário à contenção desse perigoso patógeno. No intuito de garantirmos a reprodutibilidade e a confiabilidade dos ensaios foi estabelecido que a manipulação do patógeno, envolvendo o cultivo e sua inoculação em animais, seriam feitos sob estreita supervisão de alunos vinculados ao laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos.

Em uma etapa inicial do trabalho foi preciso definir alguns parâmetros importantes de formulação a ser utilizada. Essa etapa foi necessária para que, em primeiro lugar, demonstrássemos a condição na qual os efeitos terapêuticos diretos da formulação pudessem ser observados. Em segundo lugar, a definição de um regime vacinal terapêutico otimizado seria importante para avaliarmos um possível efeito sinérgico em relação à quimioterapia anti-PCM. Para isto, realizamos uma série de experimentos voltados para a determinação da concentração ótima de P10 a ser incorporado na formulação, número de doses da vacina a ser administrada após o desafio, intervalo entre as doses, e comparação entre as vias de administração (i.n. e s.c.). Embora consumindo uma parcela significativa do tempo disponível para a realização do trabalho, tais etapas experimentais foram fundamentais para definirmos um procedimento adequado e nos alertaram sobre as principais dificuldades experimentais inerentes à execução da proposta.

Tendo em vista que a redução da concentração do peptídeo representaria em termos financeiros uma grande vantagem. No primeiro regime vacinal empregado utilizamos três doses da vacina contendo diferentes quantidades do peptídeo P10 e *FliCd*. Assim como observado em trabalhos anteriores, quando menores quantidades do peptídeo P10 eram

incorporadas em partículas de PLGA, nós também observamos uma redução parcial no número de propágulos do fungo no pulmão dos animais tratados com 2,5 µg de P10 e FliCd (AMARAL et al., 2010). Embora essa redução não fosse estatisticamente significativa, nós observamos granulomas pulmonares mais delimitados. De fato, não podemos explicar os possíveis mecanismos envolvidos na eliminação parcial da carga fúngica no pulmão, uma vez que a análise de citocinas produzidas por células de pulmão não demonstraram um padrão polarizado de resposta imune para o tipo Th1, como é comumente observado com outras formulações que utilizaram o P10 como antígeno vacinal (TABORDA et al., 1998; MARQUES et al., 2006, 2008; BRAGA et al., 2009). Contudo, observações recentes demonstraram o envolvimento de células Th17, produtoras da citocina IL-17, na indução de polimorfonucleares (PMN) (LOURES et al., 2009). Como no presente trabalho esse parâmetro não foi avaliado, tal observação sugere que a ativação desses PMN seriam os responsáveis pelos efeitos fungicidas parcialmente encontrados nesses animais. Sendo assim, as próximas etapas do trabalho foram feitas com menor concentração do peptídeo P10.

Outro ponto importante observado no presente estudo foi o número de doses necessárias para atingir o efeito anti-fúngico. Inicialmente testamos o regime vacinal baseado em três doses, usualmente empregado em outras abordagens vacinais em modelo experimental (BARGIERI et al., 2008; LE MOIGNE; ROBREAU; MAHANA, 2008; BARGIERI et al., 2010). No nosso trabalho essa estratégia utilizada não nos permitiu visualizar níveis de proteção mensuráveis, como observado quando a estratégia profilática foi utilizada. Certamente, quando P10 e FliCd foram administrados profilaticamente, a vacina foi capaz de primar de forma eficiente as células do sistema imune dos camundongos gerando uma resposta inicial que envolveu APCs, particularmente células dendríticas que expressam o receptor para flagelina (CD11c⁺ tlr5^{+/+}), e células virgens. Após a administração da segunda dose, células T efectoras e células de memória entraram em ação, porém uma resposta de maior amplitude foi alcançada quando os camundongos receberam a terceira dose e posteriormente foram desafiados com a linhagem virulenta Pb18. As células de memória dos camundongos imunizados agiram rapidamente para conter o patógeno *P. brasiliensis* (MEANS et al., 2003; BATES et al., 2009; BRAGA et al., 2009). Como esse nível de proteção não foi observado, quando a estratégia terapêutica foi utilizada, a resposta imune inicial desenvolvida quando esses animais foram infectados com Pb18 influenciou na resposta obtida após o tratamento. O intervalo entre o número de doses também pode ter influenciado nos resultados encontrados. Embora, Ribeiro et al., (2009) tenham obtido sucesso com a estratégia terapêutica utilizada com intervalos de quinze dias, a maioria dos trabalhos que envolvem imunoterapia para PCM

empregam intervalos menores entre as doses, porém com maior número de doses (TABORDA et al., 1998; MARQUES et al., 2006; BUISSA-FILHO et al., 2008; RITTNER, 2008).

Tais observações nos levaram a modificar o número e o intervalo entre as doses. Somente o fato de reduzirmos o intervalo entre as doses para uma semana foi suficiente para obtermos resultados mais promissores. Talvez por ser tratar de uma imunoterapia e não profilaxia, uma exposição frequente à formulação vacinal mostra-se necessária para a correta modulação do sistema imune que, no quadro de infecção crônica, se encontra alterado pela exposição ao patógeno. Por outro lado, quando cinco doses foram administradas nos animais houve exacerbação da doença. De fato, exposições repetidas ao mesmo antígeno podem levar a um mecanismo de tolerância por induzir anergia nas células efetoras, sendo possivelmente um mecanismo de escape desenvolvido pelo *P. brasiliensis*. Os altos níveis detectados de IL-4 devem estar associados com o agravamento da doença pelo fato de ser essa a citocina responsável por induzir a diferenciação de células T virgens para linfócitos do tipo Th2. No entanto, recentemente foi demonstrado que a IL-4 pode atuar tanto na proteção como na exacerbação da doença dependendo do padrão genético do hospedeiro (PINA et al., 2004; ARRUDA et al., 2004). Embora não tenhamos observado um padrão polarizado para o tipo Th1 de resposta nos animais que receberam 3 e 4 doses, uma expressão maior de IFN- γ foi detectada nos animais que receberam quatro doses. Desta forma, como associamos o IFN- γ com a proteção da doença e o uso frequente na literatura, optamos por usar o regime vacinal de quatro doses nas etapas seguintes.

Dois pontos importantes merecem destaque em nossa proposta em relação ao uso da via de mucosa para a administração da vacina. Em primeiro lugar, uso de formulações vacinais por essa via reduzem eventuais riscos de contaminação e reduzem o trauma nos animais por não necessitar de agulhas. Em segundo lugar, os resultados promissores obtidos com o uso profilático da vacina (BRAGA et al., 2009). No entanto, os níveis de proteção encontrados embora consideráveis, não atingiram valores tão expressivos como aqueles observados quando a vacina foi administrada de forma profilática. Uma série de trabalhos que utilizaram a via intranasal em estratégias vacinais tem sido descrito na literatura apresentando bons resultados por se mostrarem particularmente promissores para patógenos do trato respiratório, pois levam à indução de uma ampla gama de respostas imunológicas, incluindo produção local de anticorpos e células de defesa responsáveis pela eliminação do patógeno (CENCI et al., 2000; STRONG; REID; CLARK, 2002; ZHANG et al., 2010; MENG et al., 2011; THUC-VY et al., 2011). Certamente, dificuldades experimentais encontradas nos

ensaios realizados não nos permitiram visualizar um nível adequado de proteção que essa via pode oferecer.

Os resultados terapêuticos pouco expressivos em ensaios baseados na administração da vacina pela via i.n nos levou a realizar um teste com uma via parenteral. Dados da literatura mostram que dependendo da via utilizada é possível obter respostas imunológicas aumentadas (OKADA et al., 2001). No entanto, os resultados observados com o uso da via s.c foram inferiores aos encontrados nos animais imunizados pela via i.n. Embora níveis elevados de IL-12 tenham sido detectados nesses animais, observamos um aumento na carga fúngica. De fato, não podemos explicar tal resultado em função do papel bem definido da IL-12, particularmente sobre macrófagos, porém existem dados que apontam para o uso de IL-12 e aumento da carga fúngica devido à exacerbação de uma resposta inflamatória (ARRUDA et al., 2002; LIVONESI et al., 2008). Contudo, dificuldades experimentais relacionadas ao ensaio de desafio com o fungo indicam que tais ensaios devam ser repetidos em condições mais adequadas de desafio com o fungo. De fato, essa via de administração mostrou ser capaz de ativar de forma significativa células apresentadoras de antígenos, como as células de Langerhans, e conseqüentemente promover ativação de respostas imunológicas capazes de conter a propagação da doença já estabelecida (MARQUES et al., 2006; COLTRI et al., 2008; AMARAL et al., 2010).

Tais observações nos intrigaram pelo fato do efeito adjuvante de flagelina já ter sido demonstrado tanto por via de mucosa como por via parental. O potencial adjuvante de flagelinas de *Salmonella sp.* já foi demonstrado repetidas vezes seja em relação ao aumento de respostas imunológicas celulares como em relação à produção de anticorpos (McSORLEY et al., 2002; CUADROS et al., 2004; DIDIERLAURENT et al., 2004; PINO; MARTIN; MICHALEK, 2005; HONKO et al., 2006; BARGIERI et al., 2008; LE MOIGNE; ROBREAU; MAHANA, 2008). Como para PCM a indução de uma resposta imune celular está relacionada com o estado protetor da doença, a flagelina representaria um adjuvante promissor. Os efeitos biológicos das flagelinas se dá, pelo menos em parte, por meio do reconhecimento e ligação ao receptor TLR5, responsável por ativar uma cascata de sinalização via MyD88 resultando na ativação de NF- κ B e conseqüentemente produção de vários mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-6, IL-8 entre outros (AKIRA e TAKEDA, 2004; MURTHY et al., 2004).

O fato de detectarmos níveis elevados de IL-6 e IL-8 no presente estudo, após a administração de flagelina de *Salmonella*, indica que a flagelina FliCd manteve suas propriedades biológicas após o processo de purificação e pode ser utilizada como adjuvante

vacinal. No entanto, trabalhos recentes mostram que as respostas imunes desencadeadas pela flagelina como adjuvante são dependentes do tipo de célula dendrítica presente e do ambiente em que esta se diferencia. De fato nossas observações permitiram notar diferenças nas respostas obtidas após o uso de diferentes vias de administração corroborando os dados descritos por outros autores (SALAZAR-GONZALEZ et al., 2007; UEMATSU et al., 2008; MIZEL e BATES., 2010). Além disso, foi proposto que o potente efeito adjuvante da flagelina é resultado de uma interação sinérgica de três eventos desencadeados pela molécula: ativação direta de células dendríticas via TLR5, produção de citocinas e quimiocinas por outras células e por fim ativação de células do endotélio vascular (SIXT et al., 2005; BATES et al., 2009; MIZEL e BATES., 2010). Devido a essas observações, acreditamos que a flagelina utilizada no presente estudo é capaz de exercer suas propriedades imunomoduladoras e adjuvantes, propriedades essas inerentes aos adjuvantes vacinais.

Em uma segunda parte do trabalho avaliamos o efeito da vacinação em combinação com o tratamento quimioterápico utilizado na PCM. Com o intuito de verificar se a adição de sulfametoxazol/trimetropim exerceria um efeito aditivo ou sinérgico sobre o bloqueio do crescimento do fungo, realizamos os mesmos testes feitos anteriormente. Infelizmente essa parte do trabalho foi a mais comprometida em função de problemas experimentais. Os resultados demonstram que a solução de antibióticos empregada não causou qualquer impacto sobre o crescimento do fungo. Na concentração utilizada seria esperado uma redução na carga fúngica nos pulmões. Esse efeito deveria ser potencializado pelo uso concomitante da imunoterapia P10 e *FliCd*. No entanto, um efeito aditivo do antifúngico à formulação vacinal não foi detectado. Trabalhos anteriores foram bem sucedidos ao usar o peptídeo P10 associado a diferentes antifúngicos, com resultados promissores mesmo em casos de anergia (MARQUES et al., 2006, 2008). Sendo assim os resultados apresentados inicialmente não demonstraram um efeito sinérgico. Embora os animais tratados por via subcutânea e submetidos ao tratamento concomitante com sulfametoxazol/trimetropim tenham apresentado menor número de UFCs, essa redução observada não foi significativa. Tais observações nos levam a acreditar que realmente nossos experimentos foram prejudicados pela falta de atividade dos antimicrobianos, pois devido às propriedades do peptídeo P10 em ativar respostas imunológicas celulares do tipo Th1 e os efeitos adjuvantes das flagelinas esperávamos que a associação com a quimioterapia levasse a níveis mais elevados de proteção terapêutica frente ao desafio com a linhagem Pb18.

Nossos resultados indicam ausência de efeito terapêutico mais expressivo da combinação P10 e *FliCd* em animais infectados com o *P.brasiliensis*. Embora dificuldades

experimentais possam estar diretamente relacionadas aos resultados encontrados, uma hipótese pode ser levantada para explicar a ausência de efeito da flagelina sobre a PCM experimental já estabelecida. Essa hipótese está relacionada com o envolvimento do sistema imune inato nas infecções fúngicas (NETEA et al., 2002; NETEA et al., 2006; DUBOURDEAU et al., 2006). Embora a ativação de receptores do tipo TLR desencadeie sinais inflamatórios capazes de controlar uma infecção, nem sempre essa sinalização pode ser benéfica uma vez que o receptor pode ser utilizado pelo fungo para promover uma infecção ainda mais severa (BELLOCCHIO et al., 2004; ROMANI, 2004). O papel desenvolvido pelo TLR5 em infecções fúngicas ainda não foi investigado. No entanto, levando em consideração os resultados apresentados no presente trabalho, é possível sugerir que esse receptor tenha algum tipo de envolvimento no crescimento *in vivo* do *P. brasiliensis*, como sugerem os altos números para a carga fúngica recuperada nos pulmões dos animais imunizados somente com *FliCd*. Para sustentar essa hipótese, recentemente foi observado que a sinalização mediado pelo TLR4 está envolvida no processo de endocitose de *P. brasiliensis* induzindo a ativação de uma via inflamatória ineficiente no controle do crescimento do fungo (LOURES et al., 2010). O envolvimento do TLR5 com células do *P. brasiliensis* poderia bloquear a interação da flagelina em células presentes no tecido infectado e, com isso, reduzir seu efeito local voltado para a modulação do sistema imunológico adaptativo. No entanto, novos experimentos devem ser realizados para que esses pontos possam ser esclarecidos.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo forneceu evidências importantes sobre o uso da formulação P10 e *FliCd* no controle terapêutico da PCM experimental. Ao contrário dos resultados observados em condições preventivas, nossos dados demonstram que a imunomodulação promovida pelo tratamento, e conseqüentemente o efeito anti-fúngico da formulação em uma condição de infecção já estabelecida, é distinta daquela observada em um animal não infectado. Tentativas de alterar o regime vacinal, seja pela proporção entre os dois componentes, número e intervalo entre doses seja pela via de administração, não causaram impactos mais significativos no processo de infecção já instalado. Tais observações nos levam a concluir que o potencial terapêutico da combinação P10 e *FliCd* é restrito frente às condições experimentais avaliadas.

No entanto, as dificuldades experimentais enfrentadas em relação à manipulação do fungo e à realização dos ensaios de desafio não nos permitem descartar de forma definitiva o uso da formulação como uma alternativa imunoterápica para o controle da PCM. De fato, dados adicionais realizados em outro contexto, demonstram que o efeito terapêutico da formulação existe e pode ser muito expressivo. Portanto, o presente trabalho deve ser encarado como uma etapa importante, mas não definitiva, sobre a avaliação da eficácia do tratamento proposto sobre a PCM experimental. Estudos adicionais a serem realizados em condições experimentais mais favoráveis devem ser feitos de forma que possamos esclarecer de forma definitiva a viabilidade terapêutica da formulação proposta.

REFERÊNCIAS¹

AMARAL, A. C.; MARQUES, A. F.; MUÑOZ, J. E.; BOCCA, A. L.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; MORAIS, P. C.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P.; FELIPE, M. S. S. Poly(lactic acid-glycolic acid) nanoparticles markedly improve immunological protection provided by peptide P10 against murine paracoccidiodomycosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 5, p. 1126-1132, 2010.

ANDERSEN-NISSEN, E.; SMITH, K. D.; BONNEAU, R.; STRONG, R. K. ADEREM, A. A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 2, p. 393-403, 2007.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

ALMEIDA, S. R.; MORAES, J. Z.; CAMARGO, Z. P.; GESZTESI, J. L.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Pattern of Immune Response to GP43 from Paracoccidiodes brasiliensis in Susceptible and Resistant Mice Is Influenced by Antigen-Presenting Cells. **Cellular Immunology**, v. 190, p. 68-76, 1998.

AMEEN, M.; TALHARI, C.; TALHARI, S. Advances in paracoccidiodomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**. v. 35, p. 576-580, 2010.

ARRUDA, C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S. S.; NASCIMENTO, F. R.; FAZIOLI, A.; VAZ, C. A.; RUSSO, M.; CALISH, V. L. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by Paracoccidiodes brasiliensis but enhances pulmonary inflammation. **Clin. Immunol.**, v. 103, n. 2, p. 185-195, 2002.

ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; PINA, A.; KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A.; FRANCO, M. F.; KELLER, A. C.; CALICH, V. L. Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidiodomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infect Immun.**, v. 72, n. 7, p. 3932-3940, 2004.

BARGIERI, D. Y.; ROSA, D. S.; BRAGA, C. J.; CARVALHO, B. O.; COSTA, F. T.; ESPÍNDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; SOARES, I. S.; FERREIRA, L. C.; RODRIGUES, M. M. New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin. **Vaccine**, v. 26, n. 48, p. 6132-6142, 2008.

BARGIERI, D. Y.; LEITE, J. A.; LOPES, S. C.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; BRAGA, C. J.; FERREIRA, L. C.; SOARES, I. S.; COSTA, F. T.; RODRIGUES, M. M. Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of Salmonella typhimurium. **Vaccine**, v. 28, n. 16, p. 2818-2826, 2010.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BATES, J. T.; UEMATSU, S.; AKIRA S.; MIZEL, S. B. Direct stimulation of *tlr5*^{+/+}CD11c cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. **J. Immunol.**, v. 182, p. 7539–7547, 2009.

BERNARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 209-221, 2008.

BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiol.**, v. 10, p. 80-87, 2002.

BRAGA, C. J. M.; MASSIS, L. M.; ALENCAR, B. C. G.; RODRIGUES, M. M. SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, L.C.S. Cytotoxic T cell adjuvant effects of three *Salmonella enterica* flagellins. **Brazilian J. Microbiol.**, v. 39, p. 44-49, 2008.

BRAGA, C. J. M.; RITTNER, G. M.; HENAO, J. E. M.; TEIXEIRA, A. F.; MASSIS, L. M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; TABORDA, C. P.; TRAVASSOS, L. R.; FERREIRA, L. C. S. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FliC flagellin. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 1700-1707, 2009.

BRAJTBURG, P. A.; POWDERKY, W. G.; KOBAYASHI, G.; MEDOFF, G. Amphotericin B: Current understanding of mechanisms of action. **Antimicrob. Agents. Chem.**, v. 34, p. 183-188, 1990.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465–2467, 2000

BRUMMER, E.; CASTANEDA E.; RESTREPO A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol.**, v. 6, p. 89-117, 1993.

BUISSA-FILHO, R.; PUCCIA, R.; MARQUES, A. F.; PINTO, F. A.; MUÑOZ, J. E.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. The Monoclonal Antibody against the Major Diagnostic Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* Mediates Immune Protection in Infected BALB/c Mice Challenged Intratracheally with the Fungus. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3321–3328, 2008.

CALICH, V. L.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 66, n. 5, p. 585-594, 1985.

CALICH, V. L.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 5, p. 615-623, 1998.

CALICH, V. L.; DA COSTA, T. A.; FELONATO, M.; ARRUDA, C.; BERNARDINO, S.; LOURES, F. V.; RIBEIRO, L. R.; DE CÁSSIA VALENTE-FERREIRA, R.; PINA, A. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 223-236, 2008.

CANO L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 5, p. 1777-1783, 1995.

CANO, L. E.; KASHINO, S. Y. S.; ARRUDA, C.; ANDRE, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M. ; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Protective Role of Gamma Interferon in Experimental Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 2, p. 800-806. 1998.

CENCI, E.; MENCACCI, A.; BACCI, A.; BISTONI, F.; KURUP, V. P.; ROMANI, L. T Cell Vaccination in Mice with Invasive Pulmonary Aspergillosis. **J. Immunol.**, v. 165, p. 381-388, 2000.

COLOMBO, A. L.; TOBÓN, A.; RESTREPO, A.; QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Med. Mycol.**, (doi:10.3109/13693786.2011.577821) p. 1-14, 2011.

COLTRI, K. C.; OLIVEIRA, L. L.; PINZAN, C. F.; VENDRUSCOLO, P. E.; MARTINEZ, R.; GOLDMAN, M. H.; CASTELO, A. P.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **Am. J. Pathol.**, v. 173, n. 2, p. 423-432. 2008.

CUADROS, C.; LOPEZ-HERNANDEZ F. J.; DOMINGUEZ, A. L.; MCCLELLAND, M.; LUSTGARTEN, J. Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. **Infection and Immunity.**, v. 72, n. 5, p. 2810-2816, 2004.

DE CAMPOS, E. P.; SARTORI, J. C.; HETCH, M. L.; DE FRANCO, M. F. Clinical and serologic features of 47 patients with paracoccidioidomycosis treated by amphotericin B. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 26, n. 4, p. 212-217, 1984.

DIDIERLAURENT, A.; FERRERO, I.; OTTEN, L. A.; DUBOIS, B.; REINHARDT, M.; CARLSEN, H.; BLOMHOFF, R.; AKIRA, S.; KRAEHENBUHL, J. P.; SIRARD, J. C. Flagellin Promotes Myeloid Differentiation Factor88-Dependent Development of Th2-Type Response. **J. Immunol.**, v. 172, p. 6922-6930, 2004.

DUBOURDEAU, M.; ATHMAN, R.; BALLOY, V.; HUERRE, M.; CHIGNARD, M.; PHILPOTT, D. J.; LATGE, J. P.; IBRAHIM-GRANET, O. *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. **J. Immunol.**, v. 177, p. 3994-4001, 2006.

FERREIRA, K. S.; LOPES, J. D.; ALMEIDA, S. R. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. **Scand. J. Immunol.**, v. 58, n. 3, p. 290-297, 2003.

IWAI, L. K.; YOSHIDA, M.; SHIKANAI-YASUDA, J.; GOLDBERG A. C.; JULIANO, M. A.; HAMMER, J.; JULIANO, L.; SETTE, A.; KALIL, J.; TRAVASSOS, L. R.; CUNHA-NETO, E. In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* frequently

recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized individuals. **Mol. Med.**, v. 9, n. 9-12, p. 209-219, 2003.

HONKO, A. N., SRIRANGANATHAN, N.; LEES C. J.; MIZEL. S. B. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1113-1120, 2006.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence; taxonomy. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL-NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Flórida: CRC Press, 1994. p. 13-25.

LE MOIGNE, V.; ROBREAU, G.; MAHANA, W. Flagellin as a good carrier and potent adjuvant for Th1 response: study of mice immune response to the p27 (Rv2108) *Mycobacterium tuberculosis* antigen. **Mol. Immunol.**, v. 45, n. 9, p. 2499-2507, 2008.

LIVONESI, M. C.; SOUTO, J. T.; CAMPANELLI, A. P.; MAFFEI, C. M. L.; MARTINEZ, R.; ROSSI M. A.; SILVA J. S. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. **Medical Mycology**, v. 46, n. 7, p. 1-10, 2008.

LOURES, F. V.; PINA, A; FELONATO, M.; CALICH, V. L. G. TLR2 Is a Negative Regulator of Th17 Cells and Tissue Pathology in a Pulmonary Model of Fungal Infection. **J. Immunol.**, v. 183, p. 1279-1290, 2009.

LOURES, F. V.; PINA, A; FELONATO, M.; ARAUJO, E. F.; LEITE, K. R. M.; CALICH, V. L. G. Toll-Like Receptor 4 Signaling Leads to Severe Fungal Infection Associated with Enhanced Proinflammatory Immunity and Impaired Expansion of Regulatory T Cells. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 1078–1088, 2010.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hypoblastomycoses americanas. **Braz. Med.**, v. 22, n. 15, p. 141-144, 1908.

MARQUES, A. F.; SILVA, M. B.; JULIANO, M. A. P.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA. C. P. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 12-13, p. 1251-1258, 2008.

MARQUES, A. F.; SILVA, M. B.; JULIANO, M. A. P.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA. C. P. Peptide immunization as an Adjuvant to Chemotherapy in Mice Challenged Intratracheally with Virulent Yeast Cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2814-2819, 2006.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 4, p. 43-44, 2010.

MATUTE, D. R.; SEPULVEDA, V. E.; QUESADA, L. M.; GOLDMAN, G. H.; TAYLOR, J. W.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 6, p. 2153-2157, 2006.

MCGINNIS, M. R.; PASSAREL, L. In Vitro testing of susceptibility of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazole and anfotericin B with consideration of philogeobetic implications. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2353-2355, 1998.

MCSORLEY, S. J.; EHST, B. D.; YU, Y.; GERWITZ, A. T. Bacterial Flagellin is a Effective Adjuvant for CD4+ T Cells In Vivo. **The J. of Immunol.**, v. 169, p. 3914-1919, 2002.

MEANS, T. K.; HAYASHI, F.; SMITH, K. D.; ADEREM, A.; LUSTER, A. D. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 170, p. 5165-5175, 2003.

MENDES-GIANNINI, M. J.; MONTEIRO DA SILVA J. L.; FÁTIMA DA SILVA, J.; DONOFRIO F. C.; MIRANDA, E. T.; ANDREOTTI, P. F.; SOARES, C. P. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 237-248, 2008.

MENG, S.; LIU, Z.; XU, L.; LI, L.; MEI, S.; BAO, L.; DENG, W.; LI, L.; LEI, R.; XIE, L.; QIN, C.; ZHANG, L. Intranasal Immunization with Recombinant HA and Mast Cell Activator C48/80 Elicits Protective Immunity against 2009 Pandemic H1N1 Influenza in Mice. **PLoS ONE**, v. 6, p. 19863, 2011.

MIZEL, S. B.; BATES, J. T. Flagellin as an Adjuvant: Cellular Mechanisms and Potential. **J. Immunol.**, v. 185, n. 10, p. 5677-5682, 2010.

MOREIRA, A. P.; DIAS-MELICIO, L. A.; SOARES, A. M. V. C. Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: Effect on H2 O2 and NO production. **Cell. Immunol.**, v. 263, n. 2, p. 196-203, 2010.

MOSMANN, T.R. Properties and functions of interleukin-10. **Adv. Immunol.**, v. 56, p. 4-25, 1994.

MURTHY, K. G. K.; DEB, A.; GOONESEKERA, S.; SZABÓ, C. Identification of conserved domains in Salmonella muenchen flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 5667-5675, 2004.

NARANJO, T. W.; LOPERA, D. E.; DIAZ-GRANADOS, L. R.; DUQUE, J. J.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Histopathological and immunologic effects of the itraconazole treatment in a murine modelo f chronic pulmonar paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 14-15, p. 1-10, 2010.

NETEA, M. G.; VAN DER GRAAF, C. A.; VONK, I. VERSCHUEREN, A. G.; VAN DER MEER, J. W. ; KULLBERG, B. J. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p.1483–1489, 2002.

NETEA, M. G.; FERWERDA, G.; VAN DER GRAAF, C. A.; VAN DERMEER, J. W.; KULLBERG, B. J. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. **Curr. Pharm. Des.**, v. 12, p. 4195–4201, 2006.

NEWTON, S. M.; JACOB, C. O.; STOCKER, B. A. Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* flagellin. **Science**, v. 244, n. 4900, p. 70-72, 1989.

PETRI JR, W. A. Antimicrobial agents. Sulfonamides, trimethoprim-sulfamethoxazole, quinolones and agents in urinary tract agents. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10th ed. New York: MacGraw-Hill, 2001. v. 44, p. 1171-1188.

PINA, A.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; MOLINARI-MADLUM, E. E.; VAZ, C. A. C. KELLER, A. C. CALICH V. L. Absence of Interleukin-4 Determines Less Severe Pulmonary Paracoccidioidomycosis Associated with Impaired Th2 Response. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 4, p. 2369-2378, 2004.

PINA, A.; BERNARDINO, S.; CALICH, V. L. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **J. Leukoc. Biol.**, v. 83, n. 5, p. 1088-1099, 2008.

PINO, O.; MARTIN, M.; MICHALEK, S. M. Cellular Mechanisms of the Adjuvant Activity of the Flagellin Component FljB of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium To Potentiate Mucosal and Systemic Responses. **Inf. And Immun.**, v. 73, n. 10, p. 6763-6770, 2005.

PINTO, A. R.; PUCCIA, R.; DINIZ, S. N.; FRANCO, F.; TRAVASSOS, L. R. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v. 18, n. 26, p. 3050-3058, 2000.

POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cellular Immunology**, v. 218, p. 87-94, 2002.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. R. Exocellular Components of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification of a Specific Antigen. **Infection and immunity**, v. 56, n. 1, p. 199-206, 1986.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. 43-Kilodalton Glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: Immunochemical Reactions with Sera from Patients with *Paracoccidioidomycosis*, *Histoplasmosis*, or Jorge Lobo's Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 1610-1615, 1991.

OKADA, N.; TSUJINO, M.; HAGIWARA, Y.; TADA, A.; TAMURA, Y.; MORI, K.; SAITO, T.; NAKAGAWA, S.; MAYUMI, T.; FUJITA, T.; YAMAMOTO, A. Administration route-dependent vaccine efficiency of murine dendritic cells pulsed with antigens. **Br. J. Cancer**, v. 84, p. 1564-1570, 2001.

RAMOS, H. C.; RUMBO, M.; SIRARD, J. C. Bacterial Flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends Microbiol.**, v. 12, n. 11, p. 509-517, 2004.

RAVINDRAN, R.; MCSORLEY, S. J. Tracking the dynamics of T-cell activation in response to *Salmonella* infection. **Immunology**, v. 114, p. 450-458, 2005.

RIBEIRO, A. M.; BOCCA, A. L.; AMARAL, A. C.; FACCIOLI, L. H.; GALETTI, F. C.; ZARATE-BLADÉS, C. R.; FIGUEIREDO, F.; SILVA, C. L.; FELIPE, M. S. DNAhsp65 vaccination induces protection in mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Vaccine**, v. 4, p. 606-613, 2008.

RITTNER, G. M. G. **Terapia gênica contra paracoccidioidomicose experimental utilizando camundongos BALB/c e B10.A e vetores de expressão de P10, HSP60 e IL-12.** 2008. 165 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. Nature of the reactive epitopes in *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide antigen. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 77-81, 1994.

ROMANO, C. C.; MENDES, G. M. J. S.; DUARTE, A. J. S.; BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine**, v. 18, n. 3, p. 57-149. 2002.

SAN-BLAS, G.; RESTREPO, A.; CLEMONS, K.; STEVENS, D. A.; SAN-BLAS, F.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R.; FIGUEROA, J. I.; HAMILTON, A. J.; BARTHOLOMEW, M. A. Paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, n. 1, p. 59-71, 1992.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v. 40, n. 3, p. 225-242, 2002.

SALAZAR-GONZALEZ, R. M.; SRINIVASAN, A.; GRIFFIN, A.; MURALIMOHAN, G.; ERTELT J. M.; RAVINDRAN, R. VELLA, A. T.; MCSORLEY, S. J. Salmonella flagellin induces bystander activation of splenic dendritic cells and hinders bacterial replication in vivo. **J. Immunol.**, v. 179, n. 9, p. 6169-6175, 2007.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; BERNARD, G.; HIGAKI, Y.; DEL NEGRO, G. M.; HOO, S.; VACCARI, E. H.; GRYSCHKE, R. C.; SEGURADO, A. A.; BARONE, A. A.; ANDRADE, D. R. Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 40, n. 4, p. 411-417, 2002.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P. A.; COLOMBO, L.; MORETTI, M. L. e grupo de consultores em paracoccidioidomicose. Consenso em paracoccidioidomicose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SILVA, S. H. M.; TELLES, F. Q.; COLOMBO, A. L.; BLOTTA, M. H. S. L.; LOPES, J. D.; CAMARGO, Z.P. Monitoring gp43 Antigenemia in *Paracoccidioidomycosis* Patients during Therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2419-2424, 2004.

SIXT, M.; KANAZAWA, N.; SELG, M.; SAMSON, T.; ROOS, G.; REINHARDT, D. P. PABST R.; LUTZ M. B.; SOROKIN. L. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. **Immunity**, v. 22, p. 19-29, 2005.

STRONG, P.; REID, K. B. M.; CLARK, H. Intranasal delivery of a truncated recombinant human SP-D is effective at down-regulating allergic hypersensitivity in mice sensitized to allergens of *Aspergillus fumigatus*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 130, p. 19-24, 2002.

TABORDA, C. P.; JULIANO, M. A.; PUCCIA, R.; FRANCO M.; TRAVASSOS, L. R. 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.**, v. 66, p. 786-793, 1998.

TABORDA, C. P.; NAKAJE, C. R.; RODRIGUES, E. M.; SILVA, L. S.; FRANCO, M. F.; TRAVASSOS, L. R. Synthesis and immunological activity of a branched peptide carrying the T-cell epitope of gp43, the major exocellular antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Scand J. Immunol.**, v. 59, n. 1, p. 58-65, 2004.

THUC-VY, L. E.; MIRONOVA, E.; GARCIN, D.; COMPANS, R. W. Induction of Influenza-Specific Mucosal Immunity by an Attenuated Recombinant Sendai Virus. **PLoS ONE**, v. 6, p. 18780, 2011.

TRAVASSOS, L. R.; RODRIGUES, E. G.; IWAI, L. K.; TABORDA, C. P. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. **Mycopathology**, v. 165, n. 4-5, p. 341-352, 2008.

UEMATSU, S.; FUJIMOTO, K.; JANG, M. H.; YANG, B. G.; JUNG, Y. J.; NISHIYAMA, M.; SATO, S.; TSUJIMURA, T.; YAMAMOTO, M.; YOKOTA, Y.; KIYONO, H.; MIYASAKA, M.; ISHII, K. J.; AKIRA, S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. **Nat. Immunol.**, v. 9, n. 7, p. 769-776, 2008.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Instituto de Ciências Biomédicas. C. P. Taborda, L. C. S. Ferreira, C. J. M. Braga, G. M. G. Rittner, L. R. R. Travassos, M. E. Sbrogio-Almeida, A. F. Teixeira, A. F. Marques. **Formulação Farmacêutica contendo flagelina co-administrada e/ou fusionada a um peptídeo (P10) e seu uso**. BR, Pat. 018090044507, 25 set. 2009. 2 f.

ZHANG, G.; GHOSH, S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 1, p. 13-19, 2001.

ZHANG, H.; WEN, K.; SHEN, J.; GENG, S.; HUANG, J.; PAN, Z.; JIAO, X. Characterization of Immune Responses Following Intranasal Immunization with the *Mycobacterium bovis* CFP-10 Protein Expressed by Attenuated *Salmonella typhimurium*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 72, p. 277-283. 2010.

YASUDA, M. A. Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 6, n. 3, p. 385-397, 2005.

YONEKURA, K.; MAKI-YONEKURA, S.; NAMBA, K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. **Nature**, v. 424, n. 6949, p. 643-650, 2003.