

ADRIANA MAGALHÃES SANTOS

Imunoproteção induzida por células dendríticas
pulsadas com peptídeo P10 derivado da gp43 de
Paracoccidioides brasiliensis

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
2010

ADRIANA MAGALHÃES SANTOS

Imunoproteção induzida por células dendríticas pulsadas com
peptídeo P10 derivado da gp43 de *Paracoccidioides*
brasiliensis

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. Carlos Pelleschi Taborda

SÃO PAULO
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Adriana Magalhães Santos.

Título da tese: Imunoproteção induzida por células dendríticas pulsadas com peptídeo P10 derivado da gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Orientador (a): Carlos Pelleschi Taborda.

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../.....considerou o (a)

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

Examinador (a)

Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Presidente

Assinatura:.....

Nome:.....

FOLHA PARA O CERTIFICADO DO COMITE DE ÉTICA

Aos meus pais - fonte de força
Ao meu irmão pela Paciência
Aos meus amigos por tudo
Til Lars for at da er alt for meg

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Carlos Pelleschi Taborda que me aceitou em seu laboratório e que sempre acreditou no meu potencial, mesmo quando eu duvidava. Agradeço por estar sempre disponível para conversar e por respeitar diferentes opiniões. Obrigada pelos ensinamentos, pela confiança, pela amizade e por ter me proporcionado essa oportunidade de crescer não apenas intelectualmente, mas como pessoa.

Ao Professor Dr. Sandro Rogério de Almeida por gentilmente ter me acolhido em seu laboratório e contribuído para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia do ICB – USP por tudo que me ensinaram durante esse período.

Ao Prof. Dr. Flávio Alterthum por sempre me receber em sua sala quando eu desesperada não sabia o que fazer, e sempre acreditar que esse trabalho seria possível.

A toda minha família que, como sempre, me apoiaram muito e torceram por meu sucesso.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e sempre foram e serão fonte máxima de inspiração.

Ao meu pai que todas as vezes que eu chegava chorando por um experimento mal sucedido sempre tentava me confortar, e pela sempre presente frase: “Você está lá para aprender”. Serei sempre sua pretinha. Amo você.

À minha mãe, além de agradecer por tudo, devo desculpas por ser o extremo do insuportável quando não atingia meus objetivos nos meus experimentos, e que por um milagre ainda me ama e sempre me apóia. Não seria nada sem você. Te amo demais.

Ao meu irmão simplesmente por ele ser ele, pois é o melhor irmão do mundo e não conseguiria chegar a lugar nenhum se ele não estivesse ao meu lado. Amo muito.

Aos meus afilhados Lucas e Daffne por terem me apoiado e, principalmente, por me perdoarem por tê-los trocados por camundongos em incontáveis finais de semanas.

A todos os meus amigos que significam tudo para mim, sendo verdadeiros irmãos, que eu acabei abandonando durante muito tempo para me dedicar a esse trabalho, e que mesmo assim ainda estão comigo. Cliff, meu "biscoito", sempre ao meu lado e acreditando em mim. Val, "toiço", sempre preocupado e me apoiando. Fogo por conseguir me alegrar em todos os momentos. Márcio, por ter me introduzido a luta livre e porque toda vez que eu chorava tinha detalhes de uma luta para me contar. Amo vocês para sempre.

To Lars who suddenly invaded my life and made me see how much I was lonely. Thank you for showing me the meaning of Love and for being by my side, even though you're actually thousands of miles away from me. You're the reason my sun rises every day and I have to thank you for all the support, for always wanting me to grow and learn more. Jeg vil ALLTID være ditt lille troll.

Ao Prof. Desidério Barbosa que sempre acreditou em mim. Por tudo que me ensinou sobre microbiologia e sobre a vida. Esse trabalho não existiria sem sua participação. Obrigada mesmo.

À Prof. Dra. Karen Spadari Ferreira por ter tornado esse mestrado possível. Com uma boa vontade gigante, e uma paciência de monge, me ensinou muito. Agradeço por estar sempre disponível, por sempre se preocupar, por dividir as tristezas dos fracassos e principalmente por vibrar com os sucessos. Agradeço de coração.

À Shirlei, técnica, amiga, irmã e mãe. Jamais serei capaz de te agradecer por tudo. Sempre querendo me ajudar, mesmo quando eu não queria ajuda. Sempre me apoiando, torcendo por mim e me incentivando. Agradeço pela oportunidade de te conhecer. Tenha sempre a certeza de que não importa onde eu estiver você sempre estará comigo. Amo você, minha mãe postiça.

À Juliana de Amorim, por me aguentar durante esses dois anos, e se tornado mais que uma colega - Uma Amiga. Obrigada pela ajuda com dúvidas imunológicas, microbiológicas ou existenciais. Obrigada por ter enlouquecido comigo e por dividir do mesmo nível de desespero que eu. Por entender minhas loucuras e sempre me apoiar quando eu inventava de fazer algo mais no meu trabalho. Saudades sempre.

À Luciana Thomaz, por não ter apagado milhões de emails que eu mandei para pedir reunião com o Prof. Tabor da, por ter me ensinado muito, por estar sempre presente e disposta a ajudar. Obrigada mesmo.

Gostaria de agradecer a jovem pesquisadora Dra. Márcia Ribeiro Pinto por ser uma pessoa excelente, apesar de ser carioca (brincadeira!!!). Nunca se negando a dividir sua imensurável inteligência e toda sua experiência. Vou levar você sempre no meu coração.

Ao meu colega de laboratório Julian Esteban por ter me ensinado tudo sobre manipulação animal e por ter uma boa vontade enorme para ajudar a todos. Desejo a você todo sucesso do mundo.

Agradeço ao aluno Lucas Dias, que veio para o nosso laboratório para aprender e acabou ensinando muito mais. Obrigada pela ajuda nos dias de experimento no biotério, lembrarei sempre dos ótimos momentos. Adorei te conhecer.

Devo agradecimentos especiais ao “Quarteto Fantástico” (Fernanda, Glauce, Luciana e Márcia) por, na reta final, me auxiliarem com seus “super poderes”. Obrigada meninas, vocês foram sensacionais.

Também gostaria de agradecer todos meus colegas de laboratório por me aguentar, principalmente em dia de experimento quando eu ficava ainda mais insuportável. Estejam certos que todos me ensinaram algo e vão sempre fazer parte desse momento tão especial na minha vida: Fernanda Dias, Adriana Menezes, Glauce Gomes, Adelaide Galvão, Renata Bueno, Paula Barbarian, Mauro Cintra, Daniel de Assis, Oriana Nader, Thalís Ferreira, Felipe Pinto e Thor Andreas. Muito obrigada.

Agradeço a todos os alunos do Prof. Sandro por me receberem sempre tão bem, em especial para a aluna Suelen Santos por ter me ajudado com a marcação e fenotipagem das células dendríticas, e que mesmo quando estava enlouquecendo no próprio projeto sempre arranjava alguns minutos para me dar atenção. Obrigada.

Ao técnico do biotério Carlos Augusto da Silva pela sua dedicação e boa vontade, cuidando tão zelosamente dos animais.

Aos secretários do Departamento de Microbiologia e da Pós-Graduação, Alice Shimabuku, Ana Maria Amaral e Naíde Farripas, pela paciência, por sempre me ajudarem, pela alegria, por me receberem sempre bem, mesmo quando eu só precisava de um pouco de atenção, e por estarem sempre prontas para nos atender.

Aos funcionários da Seção de Esterilização, José, Elza e Elaine pela colaboração e apoio técnico, essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários do Serviço de Biblioteca do ICB, sempre bem humorados, pacientes e dispostos a ajudar.

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

E por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a minha própria pessoa por ter sido uma verdadeira Viking durante esses anos de mestrado. Por ter aguentado firme e não ter desistido. E que agora, mesmo depois de tantas lágrimas derramadas, pode levantar a cabeça e ter a certeza que fez tudo o que foi possível para desenvolver um belo trabalho. Valeu Adriana.

From The First Birth Of Life
Till Our Final Last Breath
You Never Thought That You Could
Make It This Far
We Don't Stop, We Keep Fighting On

Derrick Green, Sepultura

RESUMO

MAGALHAES, A. **Imunoproteção induzida por células dendríticas pulsadas com peptídeo P10 derivado da gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis***. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica prevalente na América Latina, é uma doença granulomatosa causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. No Brasil, a PCM é considerada a décima causa de morte dentre as doenças infecciosas e parasitárias. Células dendríticas são as células apresentadoras de antígenos mais eficientes, e quando utilizadas como adjuvante elas são de 100 a 1000 vezes mais eficientes na apresentação de um peptídeo que um adjuvante não específico. O peptídeo P10 é um trecho específico de 15 aminoácidos derivado da gp43 excretada pelo fungo, que é reconhecido pelos linfócitos T induzindo uma resposta preferencialmente do tipo Th1 e conferindo proteção no modelo experimental. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo analisar a eficiência das células dendríticas pulsadas com o P10 em ativar uma resposta protetora em camundongos infectados com *P. brasiliensis*. Para linfoproliferação, esplenócitos de camundongos imunizados com o P10 foram reestimulados *in vitro* com o peptídeo na presença ou não de células dendríticas, os resultados indicam que quando o peptídeo é apresentado pelas células dendríticas a proliferação dos esplenócitos é significativamente maior do que quando utiliza-se apenas o peptídeo. Para os ensaios *in vivo*, camundongos BALB/c infectados com o fungo receberam diferentes tratamentos, tanto profilático quanto terapêuticos, com as células dendríticas pulsadas com o P10, os resultados mostram que os animais vacinados apresentaram uma diminuição significativa da carga fúngica nos pulmões e que a utilização de diferentes vias (subcutânea e intravenosa) pode influenciar no resultado final dependendo do protocolo aplicado. A dosagem de citocinas apontou aumento de IFN- γ e IL-12 e diminuição de IL-4 e IL-10 nos camundongos tratados, e nas análises histológicas observou-se melhoria do tecido pulmonar dos animais tratados com a vacina, evidenciando o potencial das células dendríticas em atuar como adjuvante na formulação de uma vacina utilizando o peptídeo P10 para o tratamento e cura da PCM.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Células dendríticas. Peptídeo P10.

ABSTRACT

MAGALHAES, A. **Immune protection by dendritic cells pulsed with peptide P10 derived from the gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis***. 2010. 95 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Paracoccidioidomycosis (PCM), a prevailing systemic mycosis in Latin America, is a granulomatous disease caused by the thermo-dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. In Brazil, PMC is ranked as the tenth cause of death among the chronic infectious and parasitic diseases. Dendritic cells are the most efficient antigen presenting cells. When used as adjuvant these cells are at least 100-1000 times more efficient presenting peptides than a non specific adjuvant. The P10 peptide is a specific sequence containing 15 amino acids derived from gp43 secreted by the fungus. It is recognized by T cells and is capable to induce a Th1 response that protects mice in a murine infection model of the disease. In the present work we used dendritic cells pulsed with P10 to elicit a protective response in mice infected with *P. brasiliensis*. In the cell proliferation assay, splenocytes from mice immunized with P10 were restimulated *in vitro* with peptide alone or together with the dendritic cells, and the results showed that dendritic cells together with peptide were capable to stimulate a stronger proliferation of the splenocytes when compared with peptide alone. For the *in vivo* assays, BALB/c mice were infected with *P. brasiliensis* and were treated with dendritic cells pulsed with P10 following different protocols; prophylactic and therapeutic. The results showed that dendritic cells pulsed with P10 were able to reduce significantly the fungi burden present in the lungs of infected mice in both protocols, and the route of administration (subcutaneous or intravenous) can affect the final result depending on the protocol administered. Cytokine analysis showed a clear increase of IFN- γ and IL-12 and a decrease of IL-10 and IL-4 cytokines levels on the treated groups, and histopathological analysis showed lung tissues with less inflamed areas comparing with the control. All that point out the importance of the adjuvant role of dendritic cells when developing a vaccine using P10 peptide for the treatment or cure of PCM.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Dendritic cells. P10 peptide.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema de imunização para os diferentes protocolos. A. Grupo terapêutico 30 dias. Os animais foram infectados e após 30 dias receberam duas doses da vacina com intervalos de 7 dias. Sete dias após a última imunização esses animais foram sacrificados. B. Grupo terapêutico 15 dias. Os animais foram infectados e receberam apenas uma dose da vacina após 15 dias de infecção, sendo sacrificados 7 dias após a imunização. C. Grupo profilático 1 dia. Esse grupo foi imunizado com a vacina e infectado 24 horas depois, sendo sacrificados 30 dias após a infecção.....52
- Figura 2** - Análise da expressão de moléculas de superfície. As células dendríticas foram diferenciadas *in vitro* a partir de células de medula óssea de camundongos e cultivadas por 7 dias em meio RPMI suplementado com rGM-CSF (30 ng/ml) e rIL-4 (15 ng/ml). As células foram retiradas e marcadas com anticorpos para moléculas de superfície anti-CD11c-FITC e anti-MHC-II-PE e a leitura foi realizada com o aparelho FacsCanto e os dados foram analisados com o auxílio do software FlowJo.....55
- Figura 3** - Curva para determinação de concentração ótima do peptídeo. Dois grupos de animais foram inoculados no coxim plantar com PBS (CSE) ou imunizados com $1,02 \times 10^{-2}$ mM do peptídeo (IP10). Após 7 dias, o baço desses animais foi retirado e as células cultivadas somente com o P10 (+P10) ou com P10 mais as células dendríticas (+DC+P10), sendo três diferentes concentrações do P10: $2,55 \times 10^{-1}$, $5,1 \times 10^{-1}$ ou $7,65 \times 10^{-1}$ mM/ml. Análise feita por Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. $p = 0,1920$56
- Figura 4** - Ensaio de proliferação celular. Foram utilizadas células totais de baço de animais controles, injetados apenas com PBS (PBS) e animais imunizados com $1,02 \times 10^{-2}$ mM do peptídeo P10 (IP10), após 72 h de estímulo com $2,55 \times 10^{-1}$ mM/ml do peptídeo (P10) ou o peptídeo ($2,55 \times 10^{-1}$ mM/ml) mais células dendríticas (+DC+P10). CSE - célula sem estímulo; ConA - mitógeno como controle positivo. Significância $p < 0,05$. *** Entre CSE+DC e IP10+DC+P10 e ### entre IP10+P10 e IP10+DC+P10. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. 57
- Figura 5** - Contagem de unidade formadora de colônia (UFC) nos pulmões dos animais do grupo terapêutico 30 dias. Os camundongos de cada grupo (N = 5) foram infectados por via intratraqueal (3×10^5 leveduras de Pb18) e após 30 dias de infecção receberam diferentes tratamentos. Grupo controle não foi tratado (C+) e os outros grupos receberam 2 doses da vacina, no 31º e 38º dias, sendo apenas células dendríticas (DC) ou células dendríticas pulsadas por 2 horas com P10, por diferentes vias - intravenosa (IV) ou subcutânea (SC). Sacrifício 7 dias após a última dose e uma fração do pulmão foi retirada para contagem de UFC. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o infectado não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey.58

- Figura 6** - Contagem de unidade formadora de colônia (UFC) nos pulmões dos animais do grupo terapêutico 15 dias. Todos os grupos (N = 5) foram infectados por via intratraqueal (3×10^5 leveduras de Pb18) e após 15 dias de infecção receberam diferentes tratamentos. Grupo controle não foi tratado (C+) e os outros grupos receberam uma dose da vacina, no 16º dia, sendo apenas células dendríticas (DC) ou células dendríticas pulsadas por 2 horas com P10, por diferentes vias - intravenosa (IV) ou subcutânea (SC). Animais foram sacrificados 7 dias após imunização e uma fração do pulmão foi retirada para contagem de UFC. ** Significância $p < 0,05$ quando comparado com o infectado não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. 59
- Figura 7** - Contagem de unidade formadora de colônia (UFC) nos pulmões dos animais do grupo profilático 1 dia. Os camundongos de cada grupo (N = 5), exceto o grupo controle (C+, infectado e não tratado), foram imunizados com a vacina. O grupo DC recebeu apenas as células dendríticas na base da cauda, os grupos IV e SC receberam as células pulsadas por 2 horas com P10, sendo essas imunizações por diferentes vias: subcutânea no grupo SC e intravenosa no grupo IV. Um dia após a imunização todos os grupos, incluindo o controle, foram infectados por via intratraqueal (3×10^5 leveduras de Pb18) e após 30 dias de infecção foram sacrificados. Uma fração do pulmão foi retirada para contagem de UFC. Significância $p < 0,05$. ** grupo SC comparado com o grupo C +, *** grupo SC comparado com o grupo IV. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. 60
- Figura 8** - Dosagem de citocinas IFN- γ e IL-12 no sobrenadante do macerado dos pulmões do grupo terapêutico 30 dias. Os animais de cada grupo (N=5) foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 30 dias receberam diferentes tratamentos (duas doses com intervalo de sete dias), o grupo DC recebeu apenas células dendríticas e os grupos IV e SC receberam as células dendríticas pulsadas com o P10 por diferentes vias, intravenosa e subcutânea, respectivamente. Animais foram sacrificados sete dias após a administração da última dose da vacina. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle infectado e não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. 62
- Figura 9** - Dosagem de citocinas IL-10 e IL-4 no sobrenadante do macerado dos pulmões do grupo terapêutico 30 dias. Os animais de cada grupo (N=5) foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 30 dias receberam diferentes tratamentos (duas doses no intervalo de sete dias), o grupo DC recebeu apenas células dendríticas e os grupos IV e SC receberam células dendríticas pulsadas com P10 por diferentes vias, intravenosa e subcutânea respectivamente. Animais foram sacrificados sete dias após a administração da última dose da vacina. * Significância $p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle infectado e não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. 63

- Figura 10** - Dosagem de citocinas IFN- γ e IL-12 no sobrenadante do macerado dos pulmões do grupo terapêutico 15 dias. Os animais de cada grupo (N=5) foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 15 dias receberam diferentes tratamentos (dose única), o grupo DC recebeu apenas células dendríticas e os grupos IV e SC receberam as células dendríticas pulsadas com P10 por diferentes vias, intravenosa e subcutânea, respectivamente. Animais foram sacrificados sete dias após a administração da vacina. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle infectado e não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. 64
- Figura 11** - Dosagem de citocinas IL-4 e IL-10 no sobrenadante do macerado dos pulmões do grupo terapêutico 15 dias. Os animais de cada grupo (N=5) foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 15 dias receberam diferentes tratamentos (dose única), o grupo DC recebeu apenas células dendríticas e os grupos IV e SC receberam as células dendríticas pulsadas com P10 por diferentes vias, intravenosa e subcutânea, respectivamente. Animais foram sacrificados sete dias após a administração da vacina. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle infectado e não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. 65
- Figura 12** - Dosagem de citocinas IFN- γ e IL-12 no sobrenadante do macerado dos pulmões do grupo profilático 1 dia. Os animais de cada grupo (N=5) receberam diferentes tratamentos (dose única), o grupo DC recebeu apenas células dendríticas e os grupos IV e SC receberam as células dendríticas pulsadas com P10 por diferentes vias, intravenosa e subcutânea, respectivamente. Um dia após a imunização, os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras e sacrificados trinta dias depois. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle infectado e não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. 66
- Figura 13** - Dosagem de citocinas IL-10 e IL-4 no sobrenadante do macerado de pulmão do grupo profilático 1 dia. Os animais de cada grupo (N=5) receberam diferentes tratamentos (dose única), o grupo DC recebeu apenas células dendríticas e os grupos IV e SC receberam as células dendríticas pulsadas com P10 por diferentes vias, intravenosa e subcutânea, respectivamente. Um dia após, os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras e sacrificados trinta dias depois. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle infectado e não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. 67
- Figura 14** - Exame histopatológico de uma fração de pulmão dos animais do grupo terapêutico 30 dias. Os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 30 dias esses receberam diferentes tratamentos que consistiam em duas doses com intervalo de sete dias. Foram sacrificados sete dias após a segunda dose. A. animais não infectados; B. animais infectados e não tratados; C. animais que receberam apenas células dendríticas; animais que receberam células dendríticas pulsadas com o peptídeo por diferentes vias: D. intravenosa e E. subcutânea. As figuras com número 1 (A1, B1, C1, D1 e E1) mostram aumento de 100 vezes e as figuras com número 2 (A2, B2, C2, D2 e E2) mostram aumento de 400 vezes, no microscópio óptico (Nikon Eclipse E200). Lâminas coradas pelo método de Gomori-Grocott. 69

Figura 15 - Exame histopatológico da fração de pulmão dos animais do grupo terapêutico 15 dias. Os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 15 dias esses receberam diferentes tratamentos consistindo em dose única. O sacrifício ocorreu sete dias após a vacinação. *A.* animais não infectados; *B.* animais infectados e não tratados; *C.* animais que receberam apenas células dendríticas; animais que receberam células dendríticas pulsadas com o peptídeo por diferentes vias: *D.* intravenosa e *E.* subcutânea. As figuras com número 1 (*A1, B1, C1, D1* e *E1*) mostram aumento de 100 vezes e as figuras com número 2 (*A2, B2, C2, D2* e *E2*) mostram aumento de 400 vezes, no microscópio óptico (Nikon Eclipse E200). Lâminas coradas pelo método Gomori-Grocott.71

Figura 16 - Exame histopatológico da fração de pulmão dos animais do grupo profilático 1 dia. Os animais receberam diferentes tratamentos um dia antes de serem infectados e após 30 dias foram sacrificados. *A.* animais não infectados; *B.* animais infectados e não tratados; *C.* animais que receberam apenas células dendríticas; e animais que receberam células dendríticas pulsadas com o peptídeo por diferentes vias: *D.* intravenosa e *E.* subcutânea. As figuras com número 1 (*A1, B1, C1, D1* e *E1*) mostram aumento de 100 vezes e as figuras com número 2 (*A2, B2, C2, D2* e *E2*) mostram aumento de 400 vezes, no microscópio óptico (Nikon Eclipse E200). Lâminas coradas pelo método de Gomori-Grocott.73

LISTA DE ABREVIATURAS

° C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> – Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> – Células apresentadoras de antígenos
CFA	<i>Complete Freund Adjuvant</i> – Adjuvante completo de Freund
CCL3	<i>C-C motif chemokine 3</i> - proteína inflamatória de macrófagos alfa
CCL4	<i>C-C motif chemokine 4</i> - proteína inflamatória de macrófagos beta
CO ₂	Dióxido de carbono
ConA	Concanavalina A
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> – Ensaio imunossorbente ligado à enzima
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> - Isotiocianato de fluoresceína
FMO	<i>Fluorescence minus one</i> – Fluorescência menos um
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> – Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
gp43	Glicoproteína de 43 kDa
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> – Vírus da imunodeficiência humana
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus type 1</i> – Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> – Antígeno leucocitário humano
HPV	<i>Human Papiloma Virus</i> – Vírus do papiloma humano
HTT	Hipersensibilidade do Tipo Tardia
i.t.	Intratraqueal
i.v.	Intravenoso
IFN-γ	Interferon-gama
IgE	Imunoglobulina E

IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2	Imunoglobulina G2
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-17	Interleucina-17
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
KHCO ₃	Bicarbonato de potássio
LIN ⁻	Células de linhagem negativa
LPS	Lipopolissacarídeo
MAB	Monoclonal antibody – Anticorpo monoclonal
MCP-3	<i>Monocyte chemotactic protein - 3</i> – proteína quimioatraente de monócitos - 3
mg	Miligrama
MHC- I	<i>Major Histocompatibility Complex – I</i> – Complexo principal de histocompatibilidade - I
MHC-II	<i>Major Histocompatibility Complex – II</i> – Complexo principal de histocompatibilidade - II
ml	Mililitro
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction – Reação leucocitária mista
mM	milimolar
MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i> – Brometo tiazoil azul tetrazólio
N	Normal
NF-κB	<i>Nuclear Factor-kappa B</i> - Fator nuclear – kapa B
ng	Nanograma
NK	<i>Natural Killer</i>
NKT	<i>T cell Natural Killer</i> – Células T <i>Natural Killer</i>
NH ₃ Cl	Cloreto de amônio
P10	Peptídeo P10
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> – Salina fosfatada tamponada

PCM	Paracoccidiodomicose
PE	<i>R-Phycoeritrin</i> - Ficoeritrina
PLGA	<i>Poly(lactic acid-glycolic acid)</i> - poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
RANTES	<i>Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted</i> – Quimiocinas reguladas sob ativação normalmente expressada e secretada por células T
rGM-CSF	<i>Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> – Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos recombinante
rIL-4	Interleucina-4 recombinante
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> – Ácido ribonucléico
s.c.	Subcutânea
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> – Eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	Soro Fetal Bovino
Th	Linfócito T <i>helper</i>
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th17	Linfócito T <i>helper</i> 17
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
TLR	<i>Toll Like Receptors</i> - Receptores semelhantes ao Toll
TMB	<i>Tetramethyl Benzidine</i> - Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TNF- β	Fator de necrose tumoral-beta
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	47
2.1 Objetivo geral.....	47
2.2 Objetivos específicos.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 Animais.....	48
3.2 Cultivo do fungo e preparo do inóculo	48
3.3 Infecção intratraqueal.....	48
3.4 Obtenção e diferenciação de células dendríticas	49
3.5 Citometria de fluxo.....	49
3.6 Definição da concentração do peptídeo	50
3.7 Ensaio de linfoproliferação	51
3.8 Ensaio de resposta <i>in vivo</i>	51
3.9 Unidade formadora de colônia (UFC)	52
3.10 Dosagem de citocinas.....	53
3.11 Histopatologia	53
3.12 Análise estatística.....	54
4 RESULTADOS	55
4.1 Caracterização e quantificação de células dendríticas por citometria de fluxo.	55
4.2 Determinação da concentração do peptídeo	56
4.3 Ensaio de proliferação celular	57
4.4 Contagem de unidade formadora de colônias.....	58
4.4.1 Grupo terapêutico 30 dias	58
4.4.2 Grupo terapêutico 15 dias	59

<i>4.4.3 Grupo profilático 1 dia</i>	60
4.5 Dosagem de citocinas	61
<i>4.5.1 Grupo terapêutico 30 dias</i>	61
<i>4.5.2 Grupo terapêutico 15 dias</i>	64
<i>4.5.3 Grupo profilático 1 dia</i>	66
4.6 Histopatológicos	68
<i>4.6.1 Grupo terapêutico 30 dias</i>	68
<i>4.6.2 Grupo terapêutico 15 dias</i>	70
<i>4.6.3 Grupo profilático 1 dia</i>	72
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS*	83

1 INTRODUÇÃO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (revisado por LACAZ, 1994). Geograficamente, limita-se a América Latina com as áreas endêmicas estendendo desde o México até a Argentina, sendo uma das micoses profundas que mais predominam na região, afetando principalmente trabalhadores rurais (FRANCO, 1987; BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; MCEWEN et al., 1995). O maior número de casos tem sido reportados no Brasil, Colômbia e Venezuela. Não se sabe o número exato de indivíduos infectados, mas estima-se que nas regiões endêmicas aproximadamente 10 milhões de indivíduos podem estar infectados, porém acredita-se que esses dados estejam superestimados. (WANKE e LONDERO, 1994; RESTREPO; MCEWEN; CASTANEDA, 2001) A PCM não é considerada doença de notificação compulsória, contudo uma nova lei no estado de São Paulo recomenda que novos casos sejam reportados (Nº 230 – DOE de 05/12/08 – p. 30).

Prado et al. (2009), avaliaram a taxa de mortalidade das principais micoses sistêmicas no Brasil no período de 1996 a 2006, sendo a PCM, em indivíduos HIV - negativos, a responsável por mais de 50% das mortes entre as micoses sistêmicas, ficando a frente de outras doenças como hanseníase, coqueluche, HIV, tuberculose e doenças causadas por protozoários, como malária e doença de Chagas.

O primeiro a descrever essa micose foi Adolf Lutz, em 1908, em um trabalho no qual analisou dois pacientes que apresentavam lesões na mucosa oral. Narrando aspectos clínicos da doença e os achados histopatológicos das lesões (LUTZ, 1908).

Em 1912, Splendore designa o fungo como *Zymonema brasiliense*, mas Floriano de Almeida, em 1930, em um trabalho onde, comparando principalmente as diferenças nas características morfológicas e biológicas do fungo da micose sul-americana e do *Coccidioides immitis*, propôs o nome de *Paracoccidioides brasiliensis*, assim classificando o novo achado em um novo gênero e espécie (SPLENDORE, 1912; ALMEIDA, 1930). A micose primeiramente descrita como Blastomicose Sul-Americana ou Doença de Lutz-Splendore e Almeida foi designada Paracoccidioidomicose em 1971, sendo esse termo aceito e empregado mundialmente desde então (LACAZ, 1982).

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo que apresenta dimorfismo térmico crescendo na forma de micélio entre 18 °C a 25 °C, que é possivelmente a forma infectante. Quando em tecidos, ou cultivado a aproximadamente 37 °C, ele assume a forma de levedura,

que é essencial para o estabelecimento da infecção, a qual corresponde a forma parasitária no tecido do hospedeiro (FRANCO, 1987; SAN-BLAS, 1993).

O habitat do *P. brasiliensis* continua até hoje desconhecido, apesar de grandes esforços para desvendá-lo. Diversos isolamentos feitos a partir de amostras de solo de diferentes locais, como Brasil (SHOME e BATISTA, 1963; MONTENEGRO et al., 1996; SILVA-VERGARA et al., 1998), Venezuela (ALBORNOZ, 1971) e Argentina (NEGRONI, 1976), sustentam a hipótese do solo ser o habitat natural do fungo. Existem registros de isolamentos a partir de outros materiais, como ração para cachorros (FERREIRA et al., 1990), vísceras de morcegos *Artibeus lituratu* (GROSE e TAMSITT, 1965), fezes de pinguins (GEZUELE, 1989) e vísceras de tatus *Dasypus novemcinctus* (BAGAGLI et al., 1998; SILVA-VERGARA et al., 2000). Contudo, a grande dificuldade de reproduzir esses resultados ainda impossibilita apontar o verdadeiro habitat do *P. brasiliensis*.

A forma mais aceita de infecção por *P. brasiliensis* é através da via respiratória pela inalação de propágulos (conídeos) que alcançam o parênquima pulmonar e se transformam em parasitas leveduriformes no tecido do hospedeiro (FRANCO, 1987). Pressupondo que o habitat do fungo é o solo e que essa contaminação ocorra pela via inalatória, atividades ligadas ao solo como, agricultura, jardinagem, corte de árvores e outras, estão estritamente relacionadas com casos da doença e podem ser consideradas como fatores de risco, devido ao fato de a maioria dos pacientes relatar ter exercido alguma atividade agrícola durante certo período da vida (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A infecção pode resultar tanto em uma condição assintomática quanto evoluir para um quadro sintomático da doença. Tendo em vista que grande parte das pessoas expostas ao fungo não desenvolvem a doença ou apenas apresentam sintomas leves, é provável que a população tenha uma resistência natural à infecção. Isso fica evidente quando se compara ao número de casos da doença com o número de pessoas presentes nas áreas endêmicas, onde a maioria jamais irá desenvolver a micose (FRANCO, 1987; BENARD, 2008).

A infecção geralmente ocorre nas duas primeiras décadas de vida, mas os sintomas normalmente só aparecem décadas mais tarde, como reativação de um foco endógeno latente (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Ocorre marcante discrepância na razão do número de casos em adultos entre homens e mulheres, variando entre dez a quinze homens para uma mulher. Esses dados estão relacionados com a presença do estrógeno, hormônio feminino, que afeta a interação inicial parasita-hospedeiro suprimindo a conversão para a forma parasítica

do fungo (SALAZAR; RESTREPO; STEVENS, 1988). Quando a doença ocorre em crianças, essa diferença entre os dois sexos não se repete e a doença se distribui uniformemente.

Pessoas infectadas pelo fungo podem ser classificadas em quatro diferentes categorias: aqueles que apenas carregam o fungo, mas não apresentam nenhum sintoma aparente; pacientes com a forma aguda/subaguda da doença; pacientes com a forma crônica e aqueles pacientes tratados que apresentam ou não sequelas (BENARD e DUARTE, 2000). Uma vez estabelecida, a doença pode desenvolver-se em dois caminhos dependendo da evolução e da idade do paciente: forma aguda ou subaguda (tipo juvenil) ou forma crônica (tipo adulto).

A forma aguda ou subaguda é responsável por 15 a 20% dos casos da doença e predomina em crianças e adolescentes, mas também acomete jovens entre 20 e 30 anos de idade. A doença progride em menos de um ano com rápida deterioração do estado do paciente, se dissemina através do sistema linfático e apresenta significativa taxa de mortalidade. A forma crônica, que corresponde grande maioria dos casos, afeta principalmente homens adultos entre 30 e 60 anos. Progride lentamente e os sintomas são observados muitos anos depois da infecção pelo fungo, ocorrendo devido a reativação de focos quiescentes. Os órgãos mais envolvidos são os pulmões, mas é comum observar focos da infecção em outros órgãos como linfonodos, pele, glândulas adrenais e membranas. Ocorre significativa morbidade devido a grave insuficiência da função pulmonar, causada pela fibrose que é observada em 32% dos pacientes com a forma crônica da doença (FRANCO, 1987; DEL-NEGRO et al., 1994; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; RESTREPO et al., 2008).

Os sintomas na forma juvenil são febre, anemia, linfonodomegalias com supuração de massa ganglionar, hipertrofia dos linfonodos cervicais, mediastinal e intra-abdominal, manifestações abdominais, cutâneas e osteoarticulares, além de hepatoesplenomegalia (WANKE e AIDE, 2009; RESTREPO et al., 2008).

Na forma crônica, apesar de os pulmões serem os órgãos mais atingidos, é comum observar focos da infecção em diferentes órgãos como mucosas, linfonodos, pele, glândulas adrenais, ossos, intestino, fígado, baço e em alguns casos envolvimento do sistema nervoso central (WANKE e AIDE, 2009; RESTREPO et al., 2008). Os sintomas não são específicos, incluindo tosse, expectoração, falta de ar, perda de peso, febre e anorexia (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993).

A diferença das formas clínicas da doença e a ocorrência da infecção assintomática estão associadas com vários fatores como sexo, padrão genético, idade, situação imunológica,

assim como a quantidade de conídios inalados (FRANCO, 1987). Outro provável fator de risco, intimamente relacionado com a doença, é o tabagismo, existindo alta frequência de fumantes, cerca de 93%, entre os pacientes. O alcoolismo, muito relatado entre os acometidos pela doença, atua como co-fator com o tabagismo para o agravamento do quadro geral do paciente (SANTOS, et al., 2003; RESTREPO et al., 2008).

No Brasil, a PCM não figura entre as micoses que mais são reportadas em pacientes com HIV, ficando atrás das classicamente relacionadas com a AIDS como criptococose, candidíase, histoplasnose e aspergilose. Muitas são as razões para tentar explicar porque, mesmo em áreas endêmicas, o número de pacientes apresentando a associação HIV/PCM é extremamente baixo. Dentre esses fatores estão: erros de diagnóstico, fatores epidemiológicos (sendo a AIDS uma doença mais urbana e a PCM mais do meio rural) e a utilização como profilaxia contra pneumocistose de sulfametoxazol/trimetoprim, droga a qual o *P. brasiliensis* também é susceptível. Apesar de pouco relatada, a possibilidade de pacientes portadores de HIV apresentarem a paracoccidiodomicose deve ser sempre considerada (GOLDANI e SUGAR, 1995; RESTREPO et al., 2008; PRADO et al., 2009).

A manifestação da doença em pacientes portadores de HIV provavelmente ocorre devido a reativação de um foco latente devido ao quadro de deficiência imunitária apresentada por indivíduos portadores de HIV. Os sintomas apresentados por esse grupo de pacientes são muito parecidos com aqueles apresentados por pacientes sofrendo a forma aguda/subaguda da doença, como febre prolongada, significativa perda de peso, linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, lesões de pele e pode ocorrer algum acometimento neurológico. A mortalidade nesse grupo é alta podendo chegar a 30% (MARQUES, 2003; RAMOS-E-SILVA e SARAIVA, 2008).

A paracoccidiodomicose representa um grande problema de Saúde Pública, pois possui alto potencial incapacitante e ocorre uma quantidade considerável de mortes prematuras. Além disso, atingem indivíduos na sua fase mais produtiva da vida causando real impacto social e econômico (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Existem diversas metodologias utilizadas para o diagnóstico da PCM, mas o método considerado padrão ouro é a identificação de elementos fúngicos do *P. brasiliensis* em exame a fresco de espécimes clínicos, como escarro ou biópsia de tecido. Testes sorológicos, como a imunodifusão em duplo gel de ágar, podem ser utilizados quando não se encontra o fungo nos testes microscópicos. Esse tipo de teste é amplamente utilizado para verificar se a resposta do paciente, diante do tratamento, é positiva ou se está ocorrendo recidiva da doença, sendo a

sensibilidade e a especificidade desse teste superior a 80% e 90%, respectivamente (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; WANKE e AIDE, 2009).

O tratamento para PCM é extremamente longo perdurando por anos. Muitos são os casos de pacientes que abandonam o tratamento e a doença retorna de forma muito mais agressiva e muitas vezes fatal. As alternativas dentre as drogas utilizadas são vastas e não existe um consenso sobre a melhor droga a ser utilizada, variando de acordo com a experiência do centro de saúde em questão. Entre as drogas de escolha estão a clássica combinação de sulfametoxazol/trimetoprim, o itraconazol, cetoconazol, fluconazol e a anfotericina B (MARQUES, 2003; RAMOS-E-SILVA e SARAIVA, 2008; RESTREPO et al., 2008).

A combinação sulfametoxazol/trimetoprim atua bloqueando a síntese de DNA do fungo e apresenta resultados satisfatórios, mas necessita longos períodos de tratamento, normalmente ultrapassando dois anos. E, apesar da vantagem de ser de baixo custo, apresenta certa toxicidade e pode levar a supressão da medula óssea, com trombocitopenia e leucopenia. A anfotericina B, que é indicada nos casos mais graves da doença, apesar de muito efetiva é muito tóxica e pode provocar morte por arritmia cardíaca e falência renal, além da necessidade de terapia complementar com derivados de sulfa para evitar recidivas. O cetoconazol mostrou resultados positivos, mas com possível ocorrência de recidivas, além de ser hepatotóxico. A droga que tem sido a mais indicada nas formas leves e moderadas da doença é o itraconazol, por ser menos tóxico, possuir menores taxas de recidivas e por diminuir o tempo de tratamento, esse consistindo em aproximadamente de seis a doze meses de terapia com essa droga (TRAVASSOS; TABORDA; COLOMBO, 2008; MENEZES; SOARES; FONTES, 2009).

Além da utilização dessas drogas, algumas medidas para acelerar a recuperação do paciente devem ser tomadas, como descanso, melhoria da dieta, correção de quadros de anemia e abandono do uso de tabaco e do consumo de álcool (RESTREPO et al., 2008).

Apesar de essas drogas conseguirem atingir os resultados esperados, na maioria dos casos, os longos períodos de tratamento acabam sendo além de um fardo para o paciente, que precisa retornar muitas vezes ao posto de atendimento para acompanhamento, dispendioso para o serviço público de saúde. Outro fator importante é que, apesar da eficácia das drogas de uso clínico, os casos de recidivas da doença ainda são frequentes. Além disso, muitas dessas drogas apresentam efeitos colaterais importantes. Por todas essas razões, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para diminuir o tempo de tratamento e

aumentar as chances de cura, ou mesmo o desenvolvimento de vacinas contra essa infecção fúngica são de grande importância e têm sido exaustivamente estudadas.

É evidente que, definir a real necessidade médica de qualquer que seja a vacina é de extrema importância. Saber se o custo-benefício da produção da vacina é favorável, e se os resultados mediante a vacinação são significativamente de fato melhores do que os tratamentos existentes, seja na prevenção ou no tratamento, são essenciais para o sucesso da vacina. E, além de identificar a população alvo que receberá a vacina, faz-se necessário saber se o sistema público de saúde é capaz de empregar uma efetiva política de vacinação (CASSONE, 2007).

As vacinas contra infecções fúngicas ficaram durante muito tempo em segundo plano devido à incidência dessas doenças ser relativamente baixa e estar geralmente ligada a determinadas áreas geográficas. A importância das infecções fúngicas aumentou muito devido ao impacto que essas estão causando na medicina moderna. Diversas razões motivaram esse maior interesse, como o aparecimento da AIDS, maior expectativa de vida da população e o aumento da administração de potentes drogas imunossupressoras utilizadas no combate a doenças auto-imunes, tumores e para prevenir a rejeição de transplantes. Além disso, existe uma crescente necessidade de investir-se em ferramentas imunológicas que possam interagir ou até mesmo substituir a quimioterapia que é utilizada rotineiramente, o que diminuiria o uso de antibióticos e conseqüentemente o surgimento de novas linhagens resistentes. Hoje em dia, essa busca é possível graças a um maior conhecimento sobre a relação fungo-hospedeiro que foi alavancado devido à genômica e proteômica, além da elucidação dos mecanismos de imunidade protetora contra as doenças fúngicas (DEEPE, 1997; CUTLER; DEEPE; KLEIN, 2007; CASSONE, 2008).

O desenvolvimento de uma vacina contra fungos encontra diversos obstáculos, como que substância utilizar como antígeno, qual adjuvante, custo-benefício, que tipo de abordagem, se profilática ou terapêutica, e principalmente qual a população-alvo que realmente se beneficiaria com um programa de vacinação contra as doenças fúngicas.

Apesar de todos esses obstáculos, o interesse em desenvolver uma vacina contra blastomicose norte-americana, coccidioidomicose e paracoccidioidomicose é crescente, mesmo que essas doenças sejam limitadas a certas áreas geográficas e o número de casos ser relativamente baixo. Todo esse interesse é porque não se sabe ao certo se o número de doentes está aumentando ou diminuindo e, principalmente devido ao fato de ser extremamente difícil

estabelecer um tratamento eficaz capaz de eliminar os focos latentes que apresentam alto risco para a saúde do paciente durante toda sua vida (CASSONE, 2007; GALGIANI, 2008).

Mesmo com esse interesse crescente, deve ter em mente que a indústria de vacinas necessita de retorno financeiro e esse é o ponto onde as vacinas contra essas infecções fúngicas encontram grande obstáculo. Um exemplo é o caso da coccidioidomicose, doença a qual as pesquisas para a vacina se arrastam por mais de meio século. Apesar de, nos Estados Unidos, o número de casos que apresentam complicações devido a doença ser similar ao de casos de paralisia devido a poliomielite, o mercado consumidor da vacina contra poliomielite é mundial, enquanto o da coccidioidomicose seria apenas local, e essa diferença é enorme quando se pensa no retorno dos recursos investidos para a fabricação de vacinas (CASSONE, 2007; GALGIANI, 2008).

Existe um consenso na literatura de que pacientes com alto risco de contrair infecções fúngicas oportunistas se beneficiariam muito com o desenvolvimento de uma vacina contra esses patógenos. Stevens (2004), em um estudo sobre vacinação contra aspergilose, listou os grupos que se beneficiariam com uma vacina profilática para essa infecção. Nesta lista aparecem: pacientes que irão receber transplante de medula óssea, antes e depois da operação; pacientes que receberão transplante de órgãos sólidos, antes do transplante para montarem resposta e adquirirão memória imunológica contra o fungo; pacientes com leucemia mieloide aguda ou com tumores sólidos; pacientes com doenças inflamatórias intestinais, antes do uso de corticosteróides e de bloqueadores de TNF- α ; além daqueles pacientes que sofrerão grandes cirurgias, ou que estão se recuperando dessas, em unidades de tratamento intensivo.

Para começar a pensar em vacinas contra infecções fúngicas é preciso identificar substâncias imunogênicas ativas que seriam capazes de promover a total eliminação dos microrganismos latentes, pois como no caso da PCM, esse é o grande desafio já que muitos casos da doença provêm da reativação de focos latentes da infecção. Com isso, uma vacina capaz não somente de ativar o sistema imune do hospedeiro, mas de guiar esse para a completa esterilização dos focos persistentes do fungo, acabaria com o risco de recidivas da doença tanto em pacientes imunodeprimidos quanto em pacientes imunocompetentes. Outro ponto chave é saber qual o tipo de resposta imune que é realmente efetiva para determinada doença e que ajudará o paciente a acabar com os focos onde estão os patógenos e, consequentemente, resistir à infecção (DEEPE, 1997; CASSONE, 2008).

Substâncias fúngicas inertes como carboidratos e proteínas são seguras para o uso em formulações de vacinas, pois não se tratam de microrganismos replicantes. Mesmo assim

devem possuir alto grau de pureza para garantir que nenhuma substância possivelmente tóxica esteja presente. Os carboidratos exibem o problema de serem fracos imunógenos e necessitam serem acoplados a fortes carreadores, como a toxina tetânica no caso do polissacarídeo glucuronoxilomana de *Cryptococcus neoformans*, ou como as mananas de *Candida albicans*, que têm sido incorporadas em lipossomos para criar uma substância imunogênica (DEEPE, 1997).

As proteínas purificadas são utilizadas em vacinas acelulares, como contra coqueluche. Com a tecnologia de proteínas recombinantes a possibilidade da utilização dessas na formulação de vacinas aumenta, pois permite a identificação de sequências específicas de aminoácidos e dessa forma podem ser eliminadas sequências não efetivas, ou até mesmo prejudiciais, e utilizar-se apenas as sequências de interesse, melhorando sua ação como imunógeno na ativação do sistema imune (DEEPE, 1997).

Outro ponto importante é o fato do limitado número de adjuvantes licenciados para o uso em humanos o que dificulta a formulação de novas vacinas, pois a maioria dos estudos experimentais utilizam o adjuvante de Freund, que é extremamente tóxico para o uso em humanos e ao mudar o adjuvante para testes em humanos, a vacina pode perder sua efetividade. Para uso em humanos, o hidróxido de alumínio foi o primeiro adjuvante a ser licenciado e ainda é o único aprovado. Esse vem sendo utilizado por mais de 70 anos e ativa principalmente resposta Th2 com produção de anticorpos. No caso de uma vacina contra infecção fúngica oportunista, os candidatos a adjuvantes que atuem tanto na resposta inata quanto na resposta antígeno-específica serão os mais efetivos para atingir a proteção (DEEPE, 1997; SEGAL et al., 2006).

A escolha da abordagem também é essencial. Saber se para a doença em questão é melhor uma abordagem profilática, para prevenir a infecção, ou terapêutica, naqueles pacientes que sofrem da doença, influenciará na eficiência da vacinação e no sucesso da vacina. Levando em consideração que a maioria das doenças fúngicas acometem determinados grupos de pacientes e envolvem reativação de focos latentes, uma imunização terapêutica seria a abordagem mais propícia, não somente para eliminar os microrganismos quiescentes como atuando na cura da infecção ativa (DEEPE, 1997; CASSONE, 2007; CASSONE, 2008).

No caso da PCM, dados clínicos e experimentais indicam que a imunidade mediada por células desempenha papel significativo na defesa do hospedeiro contra a infecção por *P. brasiliensis*, resultando na formação de granulomas bem definidos e que conseguem limitar a

infecção. Nas formas mais severas das manifestações clínicas, assim como o aumento da disseminação da doença, estão associadas com forte resposta imune humoral, com altos títulos de anticorpos específicos não protetores, e a inibição da imunidade celular contra o agente infeccioso (ARANGO e YARZABAL, 1982; FRANCO, 1987; BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993).

Estudos realizados por Calich et al. (1985), mostraram diferentes graus de susceptibilidade e resistência frente a PCM em diferentes linhagens de camundongos, sendo a linhagem A/SN considerada resistente e a B10.A a mais susceptível. Camundongos susceptíveis conseguem montar resposta celular, medida pelo teste de hipersensibilidade do tipo tardia (HTT), no início da infecção, mas com a disseminação da doença comportam-se como anérgicos com resposta imune celular fraca, ineficiente e até mesmo negativa.

Com o aumento da carga fúngica nos tecidos, aumenta a quantidade de material antigênico que serve como estímulo constante para produção de anticorpos que podem não serem protetores. Os animais resistentes são capazes de desenvolver uma resposta celular eficiente durante os estágios mais avançados da doença, com ativação principalmente de fagócitos, e tornam-se capazes de restringir a infecção fúngica não permitindo disseminação para outros locais. Esses resultados experimentais simulam bem o que ocorre na paracoccidiodomicose humana crônica (CASTANEDA et al., 1988; SINGER-VERMES et al., 1993; CANO et al., 1995; CALICH; VAZ; BURGER, 1998).

Puccia et al., em 1986, estudaram os componentes extracelulares secretados pelas leveduras de *P. brasiliensis* crescidas em meio líquido. Os componentes com reatividade alta em testes de imunodifusão foram isolados por colunas de gel-filtração, passagem em coluna de Sepharose e o material eluído foi analisado em SDS-PAGE revelando componentes de diferentes pesos moleculares. Dentre esses componentes, apenas a glicoproteína de 43 kDa era imunoprecipitada por 100% dos soros de pacientes infectados em estudos de imunoprecipitação (PUCCIA e TRAVASSOS, 1991).

Além de ser imunodominante para produção de anticorpos, a gp43 aumenta a adesão das células fúngicas nas células epiteliais dos tecidos infectados, favorecendo a invasão pelo fungo por ser um ligante de laminina (VICENTINI et al., 1994). A gp43 tem sido muito utilizada no diagnóstico da PCM, sendo considerada como principal componente antigênico do fungo e aumentando a especificidade e sensibilidade dos testes sorológicos (CAMARGO et al., 1994; TABORDA e CAMARGO, 1994).

Taborda et al., selecionaram diferentes sequências de aminoácidos a partir da gp43 e utilizaram esses em ensaios de linfoproliferação. Uma sequência constituída por 15 aminoácidos, denominada P10 (QTLIAIHTLAIRYAN), foi único peptídeo capaz de induzir proliferação de linfócitos T previamente estimulados tanto com a gp43 quando com o P10 em conjunto com adjuvante completo de Freund (CFA). Observaram que a imunização de camundongos com o peptídeo resulta em uma proteção vigorosa contra desafio com o isolado virulento de *P. brasiliensis*, levando ao desenvolvimento de uma infecção pulmonar 200 vezes menos intensa que nos animais não imunizados e evitando disseminação para baço e fígado. O efeito protetor do P10 é atribuído a forte resposta imune celular mediada pela secreção de IFN- γ e IL-2 por linfócitos T, tendo a vantagem de não induzir resposta humoral protetora (TABORDA et al., 1998).

Em um outro estudo, os autores investigaram a combinação do P10 com as drogas de uso comum no tratamento da PCM, como o itraconazol e a combinação sulfametoxazol/trimetoprim, em camundongos anérgicos. Observaram que os camundongos que recebiam a droga e o peptídeo P10 apresentavam resposta Th1 protetora com níveis elevados de IFN- γ e IL-12, além de redução no número de granulomas (MARQUES et al., 2008).

O P10 também foi utilizado em formulações de uma vacina intranasal utilizando como adjuvante a flagelina FliC de *Salmonella enterica*. Nesse trabalho observou-se que a administração do peptídeo sintético fusionado geneticamente com a flagelina conseguiu proteger os camundongos do desafio com o *P. brasiliensis*, protegendo os animais de uma proliferação exacerbada do fungo e apresentando tecido pulmonar muito mais preservado do que os observados em animais somente infectados (BRAGA et al., 2009).

Foi demonstrado que o P10 se trata de um peptídeo promíscuo, capaz de se ligar em diferentes moléculas de HLA-DR, sendo um importante candidato vacinal para ser utilizado em humanos (IWAI et al., 2003).

O papel dos anticorpos em infecções fúngicas ainda não está bem definido e torna-se difícil a correlação, pois se existe algum defeito ou falha na imunidade mediada por anticorpos essa normalmente é acompanhada por falhas na imunidade celular. Estudos *in vitro* demonstram que a imunidade humoral ajuda não somente eliminar o patógeno, como também resulta em melhora da resposta celular (CASADEVALL, 1995).

Resposta imune mediada por anticorpos contra fungos, principalmente contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, têm sido alvo de diversos estudos em modelos

experimentais. Os resultados encontrados nesses estudos mostram que alguns anticorpos, chamados de anticorpos protetores, podem mudar o curso da infecção de modo positivo e beneficiar o hospedeiro. Pesquisadores observaram que a imunidade humoral contribui com a defesa do hospedeiro por diversos mecanismos, como opsonização e conseqüentemente aumento da fagocitose, neutralização de proteases extracelulares, aumento da apresentação de antígenos e elevação nos níveis de óxido nítrico produzidos por macrófagos (CASADEVALL, 1995).

No caso da PCM humana, altos títulos de anticorpos refletem a extensão da disseminação da infecção, sendo esses mais elevados na forma aguda/subaguda da doença, tendo valor para prognóstico (CASTANEDA et al., 1993; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Um estudo analisando anticorpos monoclonais contra gp70 do *P. brasiliensis* mostrou que camundongos infectados e imunizados com esses anticorpos durante o período de infecção (45 dias), evitavam a estabilização e o desenvolvimento da doença e apresentaram diminuição da carga fúngica nos pulmões (MATO GROSSO et al., 2003).

Buissa-Filho et al. (2008) mostraram, em um ensaio experimental utilizando camundongos BALB/c infectados com o *P. brasiliensis*, que a administração de certos anticorpos monoclonais, em especial o MAB 3E, foi capaz de reduzir a carga fúngica nos pulmões desses animais. Além disso, *in vitro*, esses anticorpos protetores foram capazes de aumentar a opsonização das leveduras, em pelo menos duas vezes quando comparado com anticorpos não protetores, elevando a atividade fagocítica dos macrófagos bem como induzindo aumento nos níveis de óxido nítrico produzido por esses. Provavelmente, o que ocorre na PCM é que existe baixa concentração de anticorpos protetores presentes no soro dos pacientes que apresentam a infecção exacerbada, o que é insuficiente para gerar proteção e controlar a doença.

A resposta imune inata, como a primeira linha de defesa do organismo, possui diversos elementos que agem controlando o crescimento inicial dos patógenos e possuem efeitos importantes na subsequente resposta adaptativa. Esse tipo de resposta contra fungos possui dois grandes propósitos: (1) efeito antifúngico direto com a destruição do patógeno, tanto pelo processo de fagocitose quanto pela secreção de compostos microbicidas; (2) e atuando como instrutora para as células do sistema imune adaptativo através da produção de mediadores pró-inflamatórios, atividade coestimulatória para as células fagocíticas e na captura e apresentação de antígenos (ROMANI, 2004; CALICH et al., 2008).

Na PCM essa primeira resposta acontece nos pulmões, onde ocorre secreção de diversas proteínas antimicrobianas e a ativação da fagocitose pelos macrófagos alveolares residentes. Como a PCM é uma doença que não é diagnosticada logo após a infecção inicial, os estudos se concentram em respostas tardias, como respostas humoral e celular (CALICH et al., 2008).

A resposta Th1, mediada pelas citocinas IL-12 e IFN- γ , é considerada como a principal na proteção contra infecções fúngicas, mas outras citocinas e vias dependentes de células T aparentam serem importantes e estão atraindo muitos estudos, como é o caso das células T reguladoras e da resposta Th17 (ROMANI, 2008).

As células Th *naive*, após ativação podem diferenciar-se em células Th1 e Th2. Células Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- β , que estimulam tanto a resposta imune inata quanto a resposta adaptativa mediada por células, essa segunda caracterizada pela atividade citolítica, portanto essencial para proteção contra patógenos intracelulares. As células Th2 produzem citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 que regulam proliferação de células B e o *switch* de classe dos anticorpos, agindo como instrutoras da resposta imune humoral (DONG e FLAVELL, 2001; WAN e FLAVELL, 2009).

A geração de resposta Th1 dominante, mediada por IL-12, é muito importante na proteção contra infecções fúngicas. Para muitos patógenos fúngicos a resposta tecidual efetiva contra a invasão é a inflamação granulomatosa, que é característica da resposta imune celular. As células Th1 produzem citocinas importantes que ativam ação citotóxica, possuem funções inflamatórias e os clones dessas células induzem as reações de HTT. Isso faz com que essas células sejam consideradas importantes instrumentos para uma ativação ótima de fagócitos nos sítios de infecção, aumentando as chances no controle de certas doenças (MOSMANN e SAD, 1996; ROMANI, 2004).

As células dendríticas possuem papel central na ativação de células T e na indução da resposta Th1 ou Th2, sendo a produção de IL-12 um fator chave para essa indução. Elas regulam ao balanço entre a produção de anticorpos da resposta Th1 (ex. IgG2) e a indução da resposta imune celular. A função central das células dendríticas é induzir a proliferação das células T. São capazes de influenciar no desenvolvimento subsequente das células T, gerando ou ativando células T reguladoras ou T efectoras que irá resultar em tolerância ou imunidade respectivamente. Também direcionam a produção de citocinas pelas células T *helper* induzindo diferentes padrões, como Th1 e Th2 (SHORTMAN e LIU, 2002; DECKER et al., 2009).

A polarização para resposta Th1, pelas células dendríticas, é regida por uma série de fatores que incluem o microambiente, o tipo de estímulo para maturação e a cinética da maturação. As células dendríticas carregando determinantes antigênicos que se ligam a MHC de classe I e II dão suporte para forte resposta imune celular Th1, regulando positivamente os genes promotores de Th1 e regulando negativamente os genes envolvidos na resposta Th2 e na resposta humoral (LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2001; DECKER et al., 2009).

A migração das células dendríticas para os linfonodos drenantes resulta em rápidas mudanças tanto nas próprias células dendríticas quanto no padrão de citocinas nas áreas de células T, levando a indução preferencial de células Th1 durante as fases iniciais da resposta imune, momento no qual as células dendríticas recém estimuladas entram nas áreas de células T em grande quantidade. Mais tardiamente, ocorre a indução de células Th2 ou células T não polarizadas, quando o influxo de células dendríticas cessa e aquelas que ainda estão presentes não produzem mais IL-12 (LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2000).

As células dendríticas foram descritas pela primeira vez por Steinman e Cohn, em 1973, quando observavam uma diferente população celular em baço de camundongos. Nesse primeiro de quatro trabalhos, ele relata a diferença na morfologia dessas células que apresentam forma estrelar com formação de pseudópodos, chamados de dendritos, e por essa razão deu o nome de células dendríticas para essa população celular. A partir desse relato, essas células foram extensivamente pesquisadas e se tornaram alvos para diversas pesquisas. Toda essa atenção que as células dendríticas despertaram deve-se principalmente à alta capacidade de essas células apresentarem antígenos para as células T.

As células apresentadoras de antígenos (APCs) podem ser consideradas como qualquer célula que expressa MHC ou outras moléculas relacionadas, como CD1, que se ligam a componentes antigênicos e que são capazes de serem reconhecidas por células T. A maioria, senão todas, as células de mamíferos podem funcionar como APC, dentre essas células destacam-se os linfócitos B, macrófagos, monócitos e células dendríticas (AUSTYN, 2000).

As células dendríticas são as mais eficazes para iniciar resposta dos linfócitos T, não somente por apresentarem moléculas ligadas ao MHC, como pela capacidade de propiciar para as células T *naive* sinais coestimulatórios responsáveis pela ativação dessas células dando início a resposta imune adaptativa. São as únicas capazes de induzir resposta imune primária, que permite o estabelecimento da memória imunológica. Essa eficácia deve-se ao fato de se localizarem estrategicamente nos pontos comuns de entrada de antígenos,

expressarem receptores com afinidade para estes, e migrarem preferencialmente para os linfonodos. Além disso, durante a maturação ocorre um aumento na expressão de moléculas coestimulatórias, essenciais para efetiva ativação dos linfócitos T (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998; BANCHEREAU et al., 2000; ITANO e JENKINS, 2003).

Diversos trabalhos mostram a diversidade de subtipos de células dendríticas, baseando-se nas diferentes vias de desenvolvimento e na expressão de marcadores de superfície.

Assim como todos os outros leucócitos, as células dendríticas são derivadas das células-tronco hematopoiéticas provenientes da medula óssea. Foram identificadas ao menos duas vias distintas de desenvolvimento de células dendríticas em camundongos, as vias mielóide e linfóide, sendo essa divergência em linhagens linfóide e mielóide um evento precoce na hematopoiese (LIU e NUSSENZWEIG, 2010). A identificação dessas vias tornou-se possível quando tanto precursores restritos mielóides quanto linfóides foram isolados de medula óssea e foram capazes de produzir células dendríticas *in vitro* (SHORTMAN e LIU, 2002).

Essas vias, linfóide e mielóide, foram evidenciadas através de estudos *in vitro* utilizando precursores mielóides em cultivo suplementado com GM-CSF (INABA et al., 1992), e precursores linfóides cultivados com uma combinação de citocinas que induz proliferação e diferenciação em células dendríticas (SAUNDERS et al., 1996). Esses dois subtipos diferem em fenótipo, localização, função, e expressam altos níveis de CD11c, MHC-II e as moléculas coestimulatórias CD86 e CD40. As células dendríticas linfóides, em camundongos, localizam-se nas áreas ricas em células T no baço e nos linfonodos. Contrário a isso, as células dendríticas mielóides encontram-se na zona marginal no baço, mas pela influência de sinais pró-inflamatórios, migram para as áreas ricas em células T (BANCHEREAU et al., 2000).

Diferente de células B ou T que podem ser facilmente identificadas pela expressão de uma imunoglobulina de superfície ou por um receptor de célula T, não existe um único antígeno de superfície que identifique todas as células dendríticas (LIU e NUSSENZWEIG, 2010), mas diferentes combinações de moléculas expressas na superfície das células dendríticas são muito utilizadas para segregação de subtipos. As moléculas de superfície de células T CD4 e CD8 são bons exemplos de marcadores para células dendríticas de camundongos, como CD11b e CD205, sendo esse último um marcador de células dendríticas interdigitantes (SHORTMAN e LIU, 2002). Apesar de ser um método muito utilizado para

caracterização dos diferentes subtipos de células dendríticas, a quantidade de moléculas de superfície expressa, ou mesmo a presença ou ausência dessas, pode indicar muito mais diferentes graus de maturação do que propriamente diferentes subtipos.

Acreditava-se que a expressão do marcador de superfície CD8 α era apenas detectada em células dendríticas de origem linfóide, mas através de diversos estudos observaram que a molécula CD8 α não é um marcador exclusivo para células dendríticas derivadas de precursores linfóides. Os resultados mostraram que tanto precursores linfóides quanto mielóides podem dar origem a tanto CD8 α^+ quanto CD8 α^- , e que a utilização de diferentes combinações de citocinas pode permitir o desenvolvimento de diversos tipos de células dendríticas, originadas por diferentes precursores celulares (SAUNDERS et al., 1996; MANZ et al., 2001; ARDAVIN, 2003).

Em humanos, o sangue é a única fonte prontamente disponível de células dendríticas, e apesar das células dendríticas de sangue humano estarem suficientemente maduras para gerarem resposta proliferativa em cultura mista de leucócitos, o sangue contém maior número de células dendríticas imaturas e plasmocitóides (SHORTMAN e LIU, 2002). No sangue, as células dendríticas e seus precursores geralmente são divididas em duas populações utilizando-se anticorpos para CD11c e CD123. As células CD11c $^-$ CD123 low possuem aparência de monócitos e são chamadas de células dendríticas mielóides, enquanto que as células dendríticas CD11c $^-$ CD123 high possuem aspectos morfológicos similares as células plasmáticas, sendo por isso chamadas de células dendríticas plasmocitóides (ADAMS; O'NEILL; BHARDWAJ, 2005).

Outros autores subdividem as células dendríticas, provenientes de sangue humano, utilizando diferentes métodos. MacDonald et al. (2002), fizeram preparações de células mononucleares de sangue periférico Lin $^-$ e HLA $^+$ e analisaram os marcadores de superfície expressos por elas. Como resultado obtiveram cinco distintos subtipos que foram identificados como CD123 high , CD1b/c $^+$, CD16 $^+$, BDCA-3 $^+$ e CD34 $^+$. Todos esses subtipos apresentam um plantel similar de moléculas de superfície, mas diferem entre si pela quantidade desses marcadores expressos.

Células dendríticas humanas podem ser obtidas pela cultura de precursores que expressam a molécula CD34, obtidas tanto de medula óssea quanto de cordão umbilical. Essas células são obtidas através da cultura *in vitro* de seus progenitores em meio suplementado com citocinas como GM-CSF e TNF- α por doze a quatorze dias dando origem a diferentes subtipos de células com morfologia e fenótipo típicos de células dendríticas (REID et al.,

1992; CAUX et al., 1996). Essas células podem se desenvolver a partir de monócitos CD14⁺ de sangue periférico cultivados em culturas suplementadas com GM-CSF e IL-4 (SALLUSTO e LANZAVECCHI, 1994).

As células dendríticas classificadas como maduras expressam CD11c e moléculas coestimulatórias como CD80, CD86 e CD40. Além disso, ainda apresentam níveis moderados de MHC-II que podem apresentar-se elevados após essas células serem ativadas (SHORTMAN e LIU, 2002). Apesar dos diferentes subtipos de células dendríticas partilharem de uma capacidade em comum, que é de apresentar antígenos para células T e promover a progressão do ciclo celular, elas diferem em outros aspectos na sinalização célula dendrítica-célula T que irá determinar o destino subsequente das células T ativadas (PULENDRAN et al., 1999).

Outro fator que pode ser influenciado pelos diferentes subtipos de células dendríticas é a quantidade e o tipo de citocinas secretadas pelas células T. Células dendríticas esplênicas fenotipadas como CD4⁻ CD8⁻ induzem as células T CD4⁺ e T CD8⁺ a secretarem níveis mais elevados de IL-2, IFN- γ , GM-CSF e IL-3 do que quando essas são ativadas por células dendríticas esplênicas CD4⁻ CD8⁺. Apesar da diferença na secreção de citocinas por esses subtipos, a proliferação das células T não é afetada, o que leva a crer que diferentes sinais governam a proliferação e a produção de citocina pelas células T (KRONIN et al., 2000).

As células dendríticas recém geradas migram da medula óssea, através da corrente sanguínea, para os tecidos não linfóides onde eventualmente se tornam células residentes, mas uma acumulação elevada de células dendríticas representa um recrutamento de seus precursores como resposta a produção local de quimiocinas devido uma inflamação local (BANCHEREAU et al., 2000). Nos linfonodos, essas células podem alcançar o órgão tanto utilizando via hematogênica, através das vênulas endoteliais altas, quanto utilizando vasos linfáticos aferentes. A vantagem na migração através de vasos linfáticos aferentes é que permite que as células dendríticas adquiram e processem antígenos nos órgão periféricos, permitindo que sejam apresentados para as células T (RANDOLPH; OCHANDO; PARTIDA-SANCHEZ, 2008).

Existem trabalhos que mostram que a principal via de migração de dendríticas para o baço é através da corrente sanguínea. Kupiec-Weglinki et al. (1988), mostraram que essa migração é dependente das células T, uma vez que quando as células dendríticas esplênicas eram injetadas em camundongos nude, elas não migravam para o baço. Quando esses animais

eram reconstituídos de células T, o nível de células dendríticas no baço se equiparava com os níveis apresentados por camundongos normais que receberam as células dendríticas.

Sabe-se que células dendríticas esplênicas não são geradas a partir de monócitos presentes em baço em repouso, mas são derivadas de outros precursores que, por estarem presentes em baixas concentrações, são difíceis de serem detectados. Existem evidências de que as células dendríticas residam no baço como células imaturas na zona marginal e que, durante a maturação ou ativação final dessas células, elas se mobilizam para as zonas de células T na polpa branca do baço (RANDOLPH; OCHANDO; PARTIDA-SANCHEZ, 2008).

Na ausência de sinais de inflamação ou de resposta imune, as células dendríticas circulam continuamente pela corrente sanguínea patrulhando os órgãos periféricos, linfa e órgãos linfóides secundários (GUERMONPREZ et al., 2002). As células dendríticas imaturas, *in vitro*, respondem a uma gama de quimiocinas através de receptores específicos e diferentes subtipos apresentam diferentes graus de sensibilidade a certas quimiocinas (BANCHEREAU et al., 2000). Células dendríticas geradas *in vitro* a partir de monócitos humanos exibem potente quimiotaxia e migração transendotelial em resposta a quimiocinas como MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES e MCP-3 (LIN et al., 1998).

A migração das células dendríticas envolve diversos eventos de adesão. As células de Langerhans, por exemplo, expressam E-caderina em suas superfícies, sendo essa uma molécula de adesão dependente de cálcio. A presença dessa molécula permite que essas células fiquem aderidas a queratinócitos na epiderme (BANCHEREAU et al., 2000). Mas, após o encontro com antígenos, ocorre regulação negativa da E-caderina que permite a migração das células de Langerhans para outros locais. Citocinas como IL-1 e TNF- α , e a endotoxina LPS além de elevarem os níveis da expressão de moléculas como MHC-II, CD40 e CD86, reduzem o nível de RNA mensageiro de E-caderina diminuindo a expressão dessa molécula na superfície das células de Langerhans o que acarreta em perda do poder de adesão dessas células (JAKOB e UDEY, 1998).

A tarefa de apresentar antígenos é bem complexa. O processamento e apresentação de antígenos podem ser afetados por diversos fatores, como a via de imunização utilizada e o período no qual o antígeno é introduzido no organismo, o local e a natureza tanto do próprio antígeno quanto da célula apresentadora que primeiro encontra esse, além do ambiente inflamatório e do adjuvante utilizado. A variedade de antígenos é imensa, e o sistema imune pode utilizar diferentes abordagens para lidar com esses, e assim a resposta a um determinado

antígeno pode ser totalmente diferente da resposta para outro (ITANO e JENKINS, 2003; TROMBETTA e MELLMAN, 2005).

Através de experimentos *in vitro* observou-se que outras células que expressam MHC-II, como macrófagos e células B, são capazes de apresentar peptídeos ligados a essas moléculas e estimular células T, mas de maneira menos eficiente que as células dendríticas (ITANO e JENKINS, 2003). Tanto macrófagos quanto células dendríticas são derivadas de precursores circulantes provenientes da medula óssea e completam a diferenciação deixando a corrente sanguínea e montando residência em tecidos periféricos. A grande vantagem das células dendríticas, em relação a essas outras células apresentadoras, é a sua capacidade de alcançar e se acumular em regiões de órgãos linfóides onde essas outras células não tem acesso (TROMBETTA e MELLMAN, 2005).

É improvável que os macrófagos, apesar de capazes, ajam como iniciadoras de resposta de células T, pois se localizam principalmente em tecidos não linfóides e em zonas nas quais as células T CD4 não estão presentes, tanto no baço quanto nos linfonodos. Do mesmo modo as células B provavelmente não estão envolvidas nessa resposta inicial por não serem encontradas em grande número nas áreas de células T. Como as células T CD4 *naive* têm pouco, ou mesmo nenhum, acesso a outras partes do corpo que não a corrente sanguínea e órgãos linfóides secundários, essa limitação indica que grande parte da ativação inicial de células T CD4 *naive* deve ocorrer em órgãos linfóides secundários, como resultado do transporte dos antígenos de tecidos não linfóides, levando a crer que as células dendríticas são as principais na iniciação de respostas de células T (ITANO e JENKINS, 2003).

Quando as células dendríticas presentes em tecidos periféricos capturam antígenos próprios ou estranhos, elas internalizam esses antígenos e os processa em peptídeos que são acoplados a moléculas de MHC de classes I e II. Quando são induzidas por sinais provenientes de patógenos, as células dendríticas entram em uma fase chamada maturação que transforma células, até então ineficientes em apresentar antígenos, em células apresentadoras profissionais extremamente eficientes em ativar células T (GUERMONPREZ et al., 2002).

Relativamente poucas células dendríticas e baixas doses de antígenos são requeridas para gerar altos níveis de proliferação e diferenciação de linfócitos. Essas células ainda controlam a magnitude, qualidade, e a memória que resulta da resposta imune (STEINMAN e POPE, 2002).

As células dendríticas encontradas nos tecidos periféricos e na corrente sanguínea são extremamente eficientes na captura de antígenos, podendo internalizar patógenos, células infectadas ou mortas, ou produtos derivados dessas para utilizar na apresentação para células T. Apesar da internalização ser essencial e normalmente acompanhada de mudanças nas células dendríticas, que as tornam mais eficientes para montar uma resposta imune, existem muitos patógenos que se utilizam dessas células como rota de infecção (BANCHEREAU et al., 2000; GUERMONPREZ et al., 2002).

Células dendríticas utilizam-se diferentes meios para internalizar antígenos, como macropinocitose, receptor de manose e fagocitose (BANCHEREAU et al., 2000). Enquanto a macropinocitose permite que as células dendríticas engolfem rapidamente, e de maneira não específica, grandes quantidades de meio fluido, os receptores de manose aumentam a capacidade de captura de antígenos com certo grau de seleção para moléculas estranhas ao organismo. A fagocitose ocorre de maneira mais específica através de certos receptores (SALLUSTO, et al., 1995; GUERMONPREZ et al., 2002).

Apesar de células dendríticas imaturas serem eficientes na endocitose de antígenos e patógenos, elas são incapazes de gerar complexos peptídeos-MHC-II dentro da célula. A exposição dessas células a sinais de maturação, como LPS, induz a ligação de peptídeos com as moléculas de MHC-II e a expressão desses complexos em suas superfícies (BRYANT e PLOEGH, 2004).

O fenômeno da maturação foi primeiramente observado por Schuler e Steinman, em 1985, quando em um experimento utilizando células de Langerhans recém retiradas da orelha de camundongos, observaram que essas eram fracas estimuladoras da proliferação de células T, mas que sofriam um aumento progressivo na capacidade de estimulação durante cultivo *in vitro*. Antígenos e patógenos induzem as células dendríticas imaturas a sofrerem mudanças fenotípicas e funcionais. Essas mudanças culminam em completa transformação das células que, ao invés de apenas capturar antígenos, transformam-se em células extremamente eficientes em apresentá-los. A maturação está intimamente ligada à migração das células dendríticas a partir de tecidos periféricos até os órgãos linfóides drenantes (BANCHEREAU et al., 2000).

A maturação envolve uma dramática reorganização estrutural o que leva ao chamado “fenótipo de maturação”. Essa maturação reflete uma ordem de eventos dependentes de certos sinais que resultam em alterações específicas na expressão de certos genes e biogênese de organelas, levando a uma potente função imunomodulatória. As células imaturas funcionais

possuem, em seus compartimentos lisossomais, grandes quantidades de MHC-II juntamente com antígenos internalizados, resultado da intensa atividade endocítica que essas células apresentam, e por isso expressam baixos níveis de MHC-II e moléculas coestimulatórias em suas superfícies (GATTI e PIERRE, 2003; TROMBETTA e MELLMAN, 2005).

As células dendríticas começam maturar imediatamente após receberem um estímulo adequado. Esse estímulo pode ser de natureza mecânica (ex. queimaduras), química (ex. toxinas) ou por material derivado de patógenos (ex. LPS). Esses estímulos podem induzir rápida ativação do fator de transcrição NF- κ B e regular positivamente a expressão do receptor de quimiocinas para auxiliar na migração para os tecidos linfóides (SILLE; VISSER; BOES, 2005).

Após o estímulo, ocorre um aumento transitório na macropinocitose, possibilitando as células a acumularem antígenos e moléculas de MHC-II recém-sintetizadas em lisossomos ou complexos ricos em MHC-II, seguida de rápida e completa regulação negativa da macropinocitose (PIERRE et al., 1997; TROMBETTA e MELLMAN, 2005). Ocorre redistribuição das moléculas MHC-II e de catepsinas para os compartimentos onde ocorrem o processamento e o acoplamento dos peptídeos, induzindo alterações na arquitetura desses compartimentos para favorecer a deposição do peptídeo ligado a MHC-II na superfície das células dendríticas (PIERRE et al., 1997; BRYANT e PLOEGH, 2004).

Além das moléculas de MHC-II, os compartimentos ricos em MHC-II acumulam outros componentes necessários para o processamento dos antígenos, incluindo a cadeia invariante, que permite que as moléculas de MHC-II sejam direcionadas do complexo de Golgi até as organelas endocíticas, e proteases como a catepsina S (TURLEY et al., 2000). As moléculas de MHC-II escapam dos compartimentos lisossômicos e são transportadas para a membrana plasmática. Finalmente, os níveis tanto de moléculas MHC-I e MHC-II, assim como de moléculas coestimulatórias, aumentam na superfície das células. As células dendríticas começam a apresentar sua morfologia característica, representada pelos dendritos e dobramentos da membrana externa. Da mesma forma aumentam a capacidade de formar e acumular o complexo peptídeo-MHC-II em suas superfícies, utilizando para isso antígenos internalizados antes do estímulo de maturação (TROMBETTA e MELLMAN, 2005).

Após as células dendríticas internalizarem os antígenos e migrarem para os linfonodos, os antígenos precisam ser apresentados como complexos peptídeos-MHC-II ou lipídeos-CD1 para os linfócitos T restritos. Essas células traduzem a informação derivada do tecido e fornecem sinais para as células T: um primeiro sinal antígeno-específico; um segundo

sinal coestimulatório e um terceiro sinal que determina a polarização de células T inativas para células Th1 e Th2 (LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2001; BOZZA et al., 2004). Os linfócitos T aparentam ser primados nos linfonodos dentro das primeiras 24 horas após imunização com antígenos intradérmicos ou subcutâneos (SILLE; VISSER; BOES, 2005). As moléculas CD1 podem apresentar tanto lipídeos endógenos quanto exógenos, e essa via pode contribuir não somente com a imunidade contra microorganismos, como também na autoimunidade e repostas antitumorais (BANCHEREAU et al., 2000).

A maneira mais simples de carregar moléculas de MHC de classes I e II é pela ligação direta de peptídeos livres com moléculas de MHC que estão expressas na superfície das células dendríticas, mas que não estão carregadas com nenhum peptídeo. Experimentalmente, essa ligação de moléculas de MHC extracelulares com peptídeos definidos é amplamente empregada em estudos de mapeamento de epítomos e em ensaios clínicos que utilizam células dendríticas pulsadas (SANTAMBROGIO et al., 1999; TROMBETTA e MELLMAN, 2005).

Além de todas essas características de processamento de antígenos e migração, as células dendríticas apresentam diversas qualidades que aumentam sua eficácia como células apresentadoras de antígenos. Dentre essas propriedades, podemos citar os altos níveis de MHC-II e moléculas coestimulatórias, sendo a expressão de CD86 pelo menos cinco vezes maior do que a expressa por células B. As células dendríticas podem desenvolver algumas funções da imunidade inata, como secretar IL-12 e IFN- α e mobilizar células NK e NKT (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998; TROMBETTA e MELLMAN, 2005).

As células dendríticas têm sido utilizadas em protocolos vacinais contra doenças infecciosas como a AIDS e HPV e principalmente no tratamento de diversos tipos de tumores (CELLUZZI et al., 1996; SANTIN et al. 1996; BANCHEREAU et al., 2001; FARKAS et al. 2006; CONNOLLY et al., 2008).

Em um estudo com onze pacientes que apresentavam melanoma avançado progressivo (estágio IV), os pacientes receberam certas doses de células dendríticas maduras derivadas de monócitos e pulsadas com um peptídeo tumoral denominado Mage-3A1. Após esse ensaio clínico, observaram temporária interrupção no crescimento dos tumores, e em seis dos onze pacientes houve total regressão de metástases na epiderme, linfonodos, pulmões e fígado. Não observaram graus de toxicidade significativos, bem como efeitos colaterais graves, apenas algumas reações nos locais de inoculação como eritema, prurido e induração. Reportaram elevação na temperatura corpórea. Esse ensaio mostrou que a vacina contendo células

dendríticas eleva os níveis de linfócitos T citotóxicos específicos para o tumor e resulta na regressão de tumores mesmo em estágio avançado (THURNER et al., 1999).

Em um ensaio clínico, doze pacientes com infecção crônica por HIV, que estavam recebendo terapia antiretroviral, foram imunizadas com células dendríticas autólogas derivadas de monócitos pulsadas *in vitro* com vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1) inativados. Os resultados mostraram que a vacinação é segura e bem tolerada. Os pacientes apresentaram diminuição na carga viral plasmática e aumento na resposta Th1 e de células T CD8⁺ específicas para HIV-1, o que não foi observado nos pacientes controles não imunizados (GARCÍA et al., 2005).

Outro estudo, que utilizou células dendríticas autólogas maduras pulsadas com HIV-1 inativado injetadas subcutaneamente, foi realizado com dezoito pacientes portadores de HIV, mas que não recebiam a terapia antiretroviral. Esse ensaio mostrou diminuição de aproximadamente 90% da carga viral plasmática em oito pacientes, e quatro apresentaram carga viral menor que 1000 cópias por ml. As únicas manifestações clínicas foram um ligeiro, mas significativo, aumento no tamanho dos linfonodos periféricos. Não foi observado sintomas da AIDS e nenhum outro sintoma de imunodeficiência desenvolveu-se durante os dois anos de acompanhamento. Os resultados mostraram que a vacina terapêutica foi capaz de induzir resposta de células T específicas contra HIV-1 associada com a manutenção da supressão viral (LU et al., 2004).

A eficácia das células dendríticas, como iniciadoras de resposta imune, também é alvo de estudos em infecções causadas por protozoários como leishmaniose, doença de chagas e malária, e contra fungos oportunistas tais como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, e *Coccidioides immitis* (RICHARDS et al. 2001; OUAISSI et al., 2002; BOZZA et al. 2004; LIN et al. 2005; SOONG, 2008).

Na PCM, as células dendríticas também foram testadas. Em um experimento *in vitro* foram avaliadas as interações entre a glicoproteína de 43 kDa (gp43) do *P. brasiliensis* e macrófagos e células dendríticas de linhagens de camundongos resistentes e susceptíveis a infecção por esse fungo. Os autores avaliaram os níveis de linfoproliferação e padrões de citocinas secretadas. Observou-se que as células dendríticas de camundongos susceptíveis são menos eficientes que as células de linhagens resistentes na estimulação da linfoproliferação. Em camundongos resistentes, as células dendríticas foram mais eficientes que macrófagos na estimulação tanto da linfoproliferação quanto das células T que secretam padrões de citocina Th1. Os resultados sugeriram que a baixa eficiência dos dois tipos celulares de camundongos

susceptíveis em estimular células T, a secretar citocinas de resposta Th1 *in vitro*, pode ser correlacionada com a progressão da doença *in vivo* (ALMEIDA e LOPES, 2001).

Ferreira et al. (2004), realizaram experimentos que mostraram que tanto o fungo quanto a gp43 purificada levam a regulação negativa de certas características das células dendríticas, tanto imaturas quanto maturadas por LPS, como diminuição nos níveis de MHC-II e nas propriedades de adesão, e igualmente interferirem na produção de certas citocinas, como IL-12 e TNF- α . As células maduras são as mais influenciadas pela presença do fungo ou da gp43, apresentando inibição acentuada na expressão de MHC-II, CD80, CD54 e CD40.

Em ensaio *in vivo*, os camundongos que recebiam células dendríticas pulsadas com gp43+LPS apresentavam um aumento significativo na carga fúngica nos pulmões. Observaram que o padrão dos granulomas nos pulmões de animais resistentes a PCM que receberam as células dendríticas pulsadas com a gp43+LPS eram muito similares àqueles encontrados em camundongos susceptíveis. Os autores sugeriram que a gp43 afeta muitas funções das células do hospedeiro, como baixa expressão de moléculas coestimulatórias e da produção de IL-12, sendo essas alterações benéficas para o fungo, pois reduzem a efetividade da resposta imune e como consequência facilitam a instalação da infecção primária em hospedeiros susceptíveis. Os resultados contribuem para explicar a persistência do fungo juntamente com um processo inflamatório duradouro (FERREIRA e ALMEIDA, 2006).

Na vacinação com células dendríticas, essas podem ser expostas a antígenos tanto *in vivo*, pela introdução direta do antígeno, quanto *ex vivo*, sendo as células pulsadas com antígenos enquanto são cultivadas e administrando as mesmas em animais compatíveis geneticamente. Células dendríticas são de 100 a 1000 vezes mais eficientes que um adjuvante não-específico, como o CFA, na apresentação de sequências peptídicas (STEINMAN e POPE, 2002).

As células dendríticas apresentam grande potencial para serem utilizadas como adjuvantes em formulações de vacinas, tanto profiláticas quanto terapêuticas, mas para que isso se torne possível é necessário identificar a resposta que se quer induzir e escolher o melhor subtipo de célula dendrítica para atingir esse objetivo. É importante escolher a via de administração, pois diferentes vias podem levar a diferentes respostas influenciando na eficácia da vacina contra determinada doença.

Nos últimos 15 anos, células dendríticas têm aumentado o interesse dos cientistas e médicos, pois essas podem ser importantes adjuvantes para vacinas que previnam infecções microbianas e para o tratamento do câncer (LIPSCOMB; WILDER; MASTEN, 2007). E, hoje

em dia, entender como manipular células dendríticas pode ser considerado um instrumento essencial no progresso de desenvolvimento de vacinas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a capacidade das células dendríticas, previamente pulsadas com o peptídeo P10, em desenvolverem resposta imune protetora em camundongos infectados com o isolado virulento de *Paracoccidioides brasiliensis* Pb18.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar diferentes protocolos vacinais, tanto terapêuticos quanto profilático, e determinar qual o melhor esquema vacinal;
- Investigar qual a melhor via de administração das células dendríticas;
- Verificar se as células dendríticas são capazes de ativar linfócitos de camundongos imunizados com o peptídeo e promover a proliferação desses *in vitro*;
- Avaliar níveis de citocina no macerado de pulmão dos animais de cada grupo;
- Quantificar a carga fúngica nos pulmões dos animais infectados e tratados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c, com média de idade entre 6 e 8 semanas. Os animais foram criados em condições sanitárias livre de patógenos específicos no biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia, e mantidos no biotério de experimentação animal do Departamento de Microbiologia. Os animais foram manuseados de acordo com as normas do Comitê de Ética do Instituto.

3.2 Cultivo do fungo e preparo do inóculo

O isolado virulento de *Paracoccidioides brasiliensis* Pb18 foi mantido em meio semi-sólido Fava-Netto durante sete dias a 37 °C. O fungo foi coletado e lavado em solução salina tamponada (PBS, pH 7,2) por três vezes. Após a decantação das partículas maiores, fez-se a contagem das leveduras em câmara de Neubauer com o sobrenadante.

Foram utilizados inóculos com viabilidade superior a 95%, sendo essa determinada por coloração com azul de Trypan (Sigma, St Louis, MO).

3.3 Infecção intratraqueal

Os camundongos foram anestesiados pela administração de 300 µl da associação de cloridrato de xilazina 10 mg/kg de peso corpóreo (Rompun, Bayer do Brasil, SP) e cloridrato de ketamina 80 mg/kg de peso corpóreo (Divisão Vetbrands Saúde Animal, Sespo, SP). Quando o animal estava insensível à dor, fez-se uma pequena incisão na região da traquéia e 50 µl de PBS contendo 3×10^5 leveduras viáveis do fungo foram inoculados utilizando-se seringa de 1 ml. A incisão foi suturada e os animais foram mantidos aquecidos sob fonte de calor moderada para controlar a hipotermia causada pelo anestésico.

3.4 Obtenção e diferenciação de células dendríticas

A obtenção das células dendríticas foi realizada de acordo com protocolo desenvolvido a partir de protocolos descritos por INABA et al. (1992) e LUTZ et al. (1999).

Fêmures e tíbias dos camundongos foram removidos e lavados em álcool 70%, seguido de duas lavagens em PBS. As medulas foram retiradas com ajuda de uma seringa contendo meio RPMI (Vitrocell - Campinas) e as células foram centrifugadas (450 g) por 5 minutos, ressuspensas em RPMI e contadas em câmara de Neubauer. A concentração de 2×10^5 células/ml foi plaqueada em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Vitrocell - Campinas), 30 ng/ml de rGM-CSF (Fator Estimulatório de Colônia de Granulócitos e Macrófagos recombinante), 15 ng/ml de rIL-4 (Peprotec) e 20 mg/ml de gentamicina (Gibco BRL Life Technologies, NY).

As células foram cultivadas por sete dias em estufa CO₂ 5% a 37 °C. No 3º dia de cultura, as células não aderentes (granulócitos em sua maioria) foram removidas delicadamente para evitar que as células dendríticas em desenvolvimento, que estão fracamente aderidas a macrófagos, fossem perdidas e o meio RPMI contendo as citocinas recombinantes foi repostado. No 5º dia, o meio foi trocado, o sobrenadante centrifugado e as células devolvidas ao meio. Isso foi feito para reduzir perda de células dendríticas que poderiam ter se soltado da cultura. No 7º dia de cultura, as populações de células dendríticas presentes no sobrenadante da cultura, foram coletadas e analisadas através de citometria de fluxo pela presença de marcadores de superfície.

3.5 Citometria de fluxo

A análise da expressão de marcadores foi feita para quantificar e caracterizar as células dendríticas. As células, após o sétimo dia de cultivo, foram lavadas com PBS, centrifugadas e ressuspensas em PBS-SFB 3% na concentração de 10^6 células por tubo. A seguir, foi feita a marcação das células utilizando-se anticorpos anti-CD11c-FITC (clone HL3; $0,5 \mu\text{g}/10^6$ células) e anti-MHC-II-PE (clone M5-114.15.2; $0,5 \mu\text{g}/10^6$ células) por 20 minutos em gelo.

Após esse período, as células foram lavadas e centrifugadas (450 g por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo as células foi ressuspendido em PBS-SFB 3%. A análise foi feita por FACS (FACSCanto II - BD, Bioscience) e os dados foram

analisados com o auxílio do software FlowJo (Tree Star, Inc. - USA). Através da técnica de *fluorescence-minus-one* (FMO) definiram-se limites para determinar células verdadeiramente positivas para a marcação com os anticorpos ou apenas autofluorescentes (ROEDERER et al., 2001).

3.6 Definição da concentração do peptídeo P10

Foi realizada uma curva com diferentes concentrações do peptídeo a fim definir a melhor concentração do P10 para utilização na elaboração da vacina. O peptídeo foi diluído previamente em solução contendo 20% de DMSO (dimetilsulfóxido, MERCK).

Dois grupos, com quatro animais cada, foram utilizados para esse experimento. O primeiro grupo foi inoculado com 50 µl de PBS (CSE – células sem estímulos) e o segundo foi imunizado com 50 µl de PBS contendo $1,02 \times 10^{-2}$ mM do peptídeo, ambos os grupos foram inoculados no coxim plantar. Após sete dias, retirou-se o baço desses animais e as células foram desagregadas em 2 ml de meio RPMI, com auxílio do êmbolo de uma seringa. Para lisar as hemácias, foram adicionados à suspensão de células 5 ml de tampão de lise (155 mM NH_3Cl , 10 mM KHCO_3 , 88 µM EDTA). Após cinco minutos de incubação, a suspensão de células foi centrifugada, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 3 ml de meio completo (RPMI, 20 mM NaHCO_3 , 10 mM HEPES, 20 mg/ml gentamicina, 2 mM L-glutamina, 50 µM β -mercaptoetanol, 5 mM piruvato de sódio; 100 mM aminoácidos não-essenciais, 1% SFB), para contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade foi determinada com azul de Trypan. As células foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração final de 4×10^5 células/poço. Nos poços que receberam as células dendríticas a concentração utilizada foi de 3 células de baço para 1 célula dendrítica.

Plaqueou-se células de baço de camundongos que receberam somente PBS (CSE) ou células de baço dos animais que receberam o peptídeo (IP10) e essas foram reestimuladas *in vitro* com diferentes concentrações do P10, $2,55 \times 10^{-1}$ mM, $5,1 \times 10^{-1}$ mM ou $7,65 \times 10^{-1}$ mM do P10. Alguns poços contendo células do grupo PBS e do grupo IP10 receberam além do peptídeo, 1×10^5 de células dendríticas diferenciadas *in vitro*. As células permaneceram em estufa de CO_2 5% a 37 °C por 72 horas e após esse período foi realizada a análise da proliferação celular segundo protocolo de Mosmann (1983). Foram adicionados 50 µl por poço de sal de tetrazolium MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide - Sigma, St Louis, MO) na concentração de 1 mg/ml e a placa voltou para estufa por mais quatro horas. Após a segunda incubação, adicionou-se em cada poço 100 µl de Isopropanol-HCl 0,04N para

dissolver os cristais de formazana e parar a reação. A leitura das absorvâncias foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se 595 nm como comprimento de onda.

3.7 Ensaio de linfoproliferação

Para a linfoproliferação foram utilizados dois grupos com quatro animais cada. Um grupo (IP10) foi imunizado no coxim plantar com $1,02 \times 10^{-2}$ mM do P10 diluído em 50 μ l de PBS, enquanto o outro grupo (PBS) recebeu apenas 50 μ l de PBS. Após uma semana, os animais foram sacrificados para a retirada do baço. Os baços dos animais foram macerados, sendo a lise das hemácias, contagem das células e plaqueamento realizados como descrito no item 3.6.

Nos poços controles foram cultivadas células de baço dos camundongos do grupo PBS com (controle positivo) ou sem (controle negativo) concanavalina A - ConA. Nos outros poços, tanto do grupo que recebeu PBS quanto do grupo que recebeu o peptídeo (IP10), células de baço foram reestimuladas com o P10 sozinho ($2,55 \times 10^{-1}$ mM) ou em conjunto com as células dendríticas por 72 horas em estufa de CO₂ 5% a 37 °C. Após esse período, a análise da proliferação celular foi realizada utilizando-se sal de tetrazolium (MTT) como descrito no item 3.6.

3.8 Ensaio de resposta *in vivo*

Para análise da modulação da resposta imune *in vivo*, foram utilizados três protocolos distintos: dois terapêuticos (A e B) e um profilático (C). Em um dos protocolos terapêuticos os animais foram infectados e receberam duas doses da vacina de células dendríticas, nos 31° e 38° dias pós-infecção, sendo sacrificados sete dias após a última dose. Esse protocolo foi denominado grupo terapêutico 30 dias. O segundo protocolo foi denominado grupo terapêutico 15 dias, onde os animais receberam dose única da vacina quinze dias após serem infectados, sendo sacrificados sete dias após a imunização. No protocolo profilático, os animais foram imunizados um dia antes de serem infectados e após trinta dias da infecção foram sacrificados. Esse protocolo foi denominado grupo profilático 1 dia.

Para a vacina, as células dendríticas, na concentração de 6×10^6 células/ml diferenciadas *in vitro* foram ressuspensas em 1 ml de PBS e incubadas com o P10 ($2,55 \times 10^{-1}$ mM /ml) por 2 horas em estufa de CO₂ 5% a 37 °C. Após essa incubação, as células

foram utilizadas na imunização dos camundongos infectados, cada dose contendo 3×10^5 células dendríticas, através de duas diferentes vias, subcutânea (s.c.) e intravenosa (i.v.). Tanto no grupo controle negativo (não infectado) quanto no grupo controle positivo (infectado e não tratado) os animais foram tratados apenas com PBS. Outro grupo, também infectado, recebeu a mesma dose de células dendríticas sem o estímulo do peptídeo pela via subcutânea, servindo como controle.

Os diferentes protocolos estão esquematizados na Figura 1.

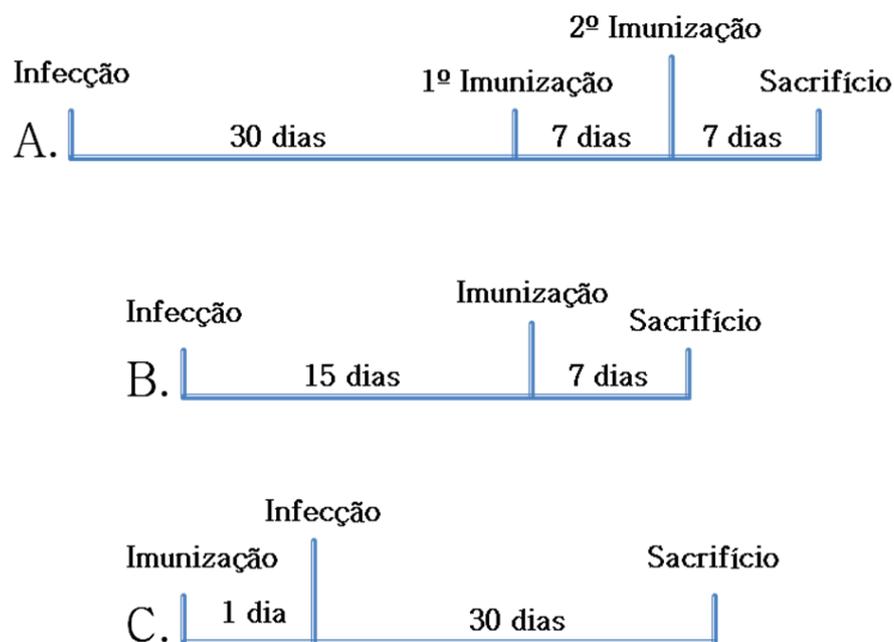


Figura 1 - Esquema de imunização para os diferentes protocolos. *A.* Grupo terapêutico 30 dias. Os animais foram infectados e após 30 dias receberam duas doses da vacina com intervalos de 7 dias. Sete dias após a última imunização esses animais foram sacrificados. *B.* Grupo terapêutico 15 dias. Os animais foram infectados e receberam apenas uma dose da vacina após 15 dias de infecção, sendo sacrificados 7 dias após a imunização. *C.* Grupo profilático 1 dia. Esse grupo foi imunizado com a vacina e infectado 24 horas depois, sendo sacrificados 30 dias após a infecção.

3.9 Unidade formadora de colônia (UFC)

Após 30 dias de infecção, nos grupos A e C, e 15 dias no grupo B, foi realizado o sacrifício dos animais, sendo os pulmões, baço e fígado retirados, pesados e macerados em 1 ml de PBS para baço e pulmão e 2 ml para fígado. Um volume de 100 μ l da suspensão foi plaqueado em meio BHI (Infusão de Coração e Cérebro – Difco - Detroit), suplementado com

4% de SFB, 5% de sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* cepa 192, 1% de estreptomicina e penicilina (Sigma, St Louis, MO), conforme recomendado por Castañeda et al. (1988). As placas foram mantidas a 37 °C por sete a quinze dias e, após esse período, as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC por grama de tecido.

3.10 Dosagem de citocinas

A detecção de citocinas como IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-4 foi realizada quantitativamente através do método de ELISA de captura (BD OpTeia, San Diego, CA), utilizando como amostra o sobrenadante de uma fração dos pulmões dos camundongos macerada em solução contendo inibidor de proteases (Sigma, St Louis, MO). As placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ l dos anticorpos de captura e mantidas *overnight* a 4 °C. As placas foram lavadas com solução PBS-0,05% Tween 20 e bloqueadas, a temperatura ambiente, com 200 μ l de PBS-10% SFB por poço. Após 1 hora de bloqueio, as placas foram submetidas a nova lavagem e 100 μ l dos padrões (citocinas recombinantes de camundongos) ou das amostras foram adicionados aos poços, com suas respectivas diluições.

Incubou-se as placas por duas horas a temperatura ambiente e essas foram novamente lavadas. Foram então adicionados em todos os poços 100 μ l do conjugado composto pelos anticorpos de detecção e a pela enzima (Avidina-HRP) e as placas foram novamente incubadas por uma hora, a temperatura ambiente. Procedeu-se a última lavagem das placas e em cada poço acrescentou-se o substrato da enzima (TMB – BD Pharmingen). As placas foram incubadas no escuro, a temperatura ambiente por trinta minutos e fez-se o bloqueio da reação com 50 μ l/poço de H₂SO₄ 2N. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Os limites de detecção das citocinas foram: 7,8 pg/ml (IL-4), 31,3 pg/ml (IFN- γ e IL-10) e 62,5 pg/ml (IL-12).

3.11 Histopatologia

Amostras de pulmão dos camundongos foram fixadas em formalina 10% (MERCK – Alemanha) e encaminhadas ao Laboratório de Histologia da Universidade de São Paulo para inclusão em parafina, preparação da lâmina e coloração pelo método de Gomori-Grocott.

3.12 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 $p < 0,05$. Apenas no gráfico da curva da concentração do peptídeo (Figura 3) foi utilizada análise de variância com dois fatores para medidas repetidas (Two-way ANOVA) e o pós-teste de Bonferroni. Sendo o resultado significativo quando o $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização e quantificação de células dendríticas por citometria de fluxo.

As células da medula óssea diferenciadas por sete dias na presença de rGM-CSF e rIL-4, foram analisadas através de citometria de fluxo pela avaliação da expressão das moléculas de superfície CD11c ligado a FITC e MHC-II ligado a PE. Pela granulosidade e tamanho das populações foi feita uma delimitação na população de interesse e dentro dessa identificou-se duas populações (A e B). Como mostra a Figura 2, 67,36% das células foram classificadas como duplo positivo para os marcadores analisados evidenciando um perfil de células dendríticas CD11⁺ MHC-II⁺.

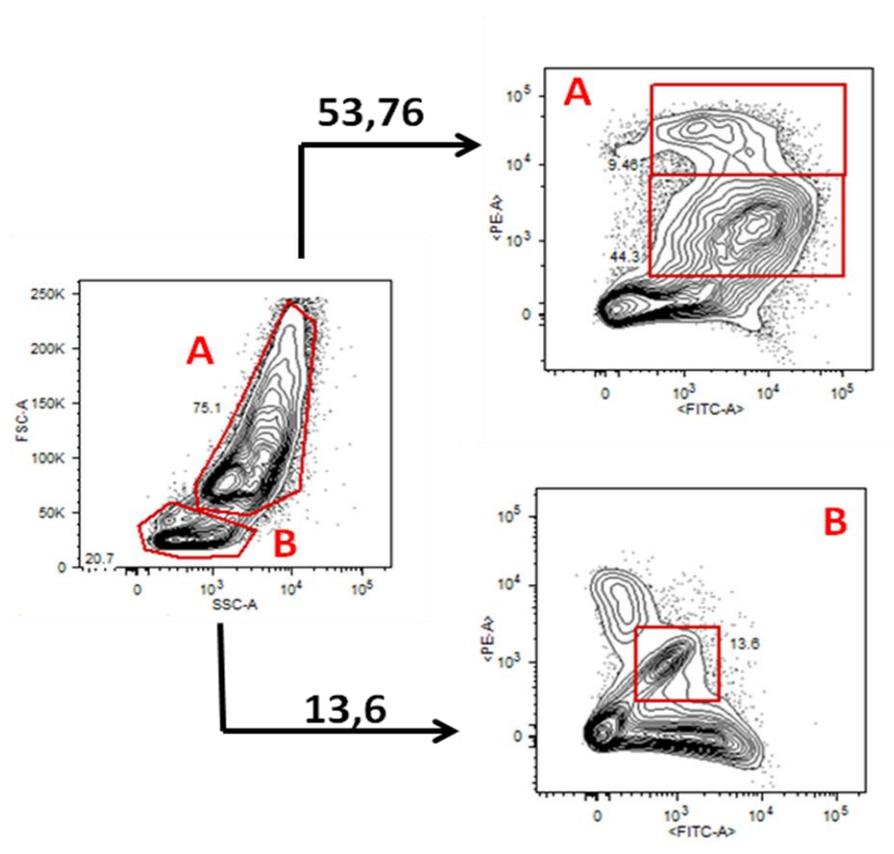


Figura 2 - Análise da expressão de moléculas de superfície. As células dendríticas foram diferenciadas *in vitro* a partir de células de medula óssea de camundongos e cultivadas por 7 dias em meio RPMI suplementado com rGM-CSF (30 ng/ml) e rIL-4 (15 ng/ml). As células foram retiradas e marcadas com anticorpos para moléculas de superfície anti-CD11c-FITC e anti-MHC-II-PE e a leitura foi realizada com o aparelho FACS Canto e os dados foram analisados com o auxílio do software FlowJo.

4.2 Determinação da concentração do peptídeo P10

A Figura 3 demonstra o ensaio realizado para determinar qual seria a melhor concentração do peptídeo para utilização com as células dendríticas. Células de baço de animais que haviam sido inoculados com PBS (CSE) ou com o peptídeo (IP10) foram cultivadas com três diferentes concentrações do peptídeo sozinho (P10), sendo essas $2,55 \times 10^{-1}$ mM, $5,1 \times 10^{-1}$ mM ou $7,65 \times 10^{-1}$ mM, ou juntamente com células dendríticas (DC).

Observamos que a proliferação das células, tanto de animais do grupo PBS quanto do grupo IP10, não apresentou diferença estatisticamente significativa independente da concentração do peptídeo. Por esse motivo, a concentração de $2,55 \times 10^{-1}$ mM foi a escolhida para a utilização nesse trabalho.

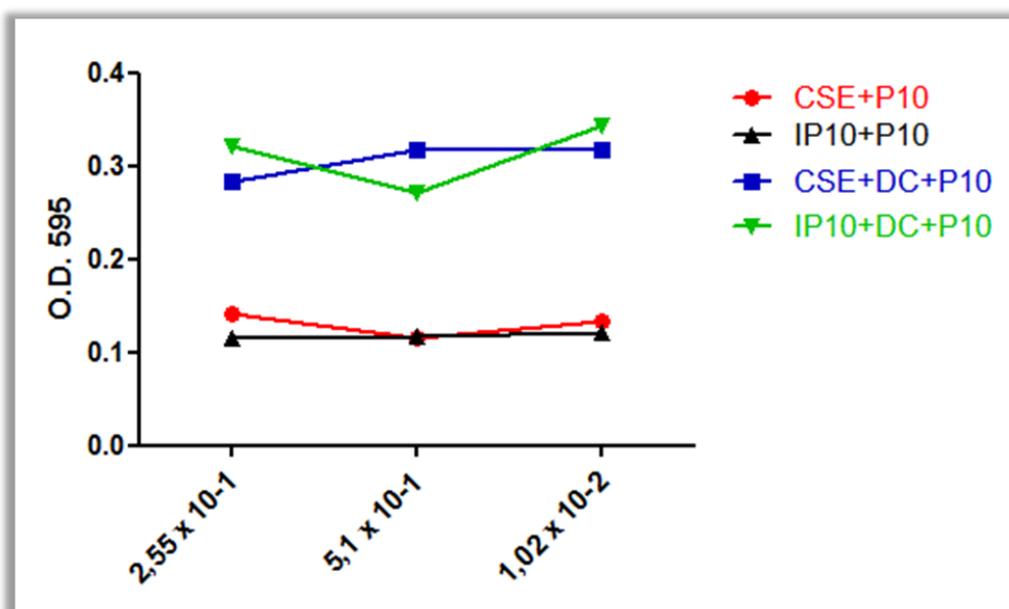


Figura 3 - Curva para determinação de concentração ótima do peptídeo. Dois grupos de animais foram inoculados no coxim plantar com PBS (CSE) ou imunizados com $1,02 \times 10^{-2}$ mM do peptídeo (IP10). Após 7 dias, o baço desses animais foi retirado e as células cultivadas somente com o P10 (+P10) ou com P10 mais as células dendríticas (+DC+P10), sendo três diferentes concentrações do P10: $2,55 \times 10^{-1}$, $5,1 \times 10^{-1}$ ou $7,65 \times 10^{-1}$ mM/ml. Análise feita por Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. $p = 0,1920$.

4.3 Ensaio de proliferação celular

Com objetivo de determinar se as células dendríticas pulsadas com o peptídeo P10 eram capazes de ativar linfócitos de baço de camundongos imunizados com o peptídeo, foi realizado um ensaio *in vitro* de ativação dessas células. Células totais de baço de camundongos controle (grupo PBS), injetados no coxim plantar com PBS, e de animais que receberam $1,02 \times 10^{-2}$ mM do peptídeo no mesmo local (grupo IP10), foram cultivadas na presença do peptídeo com (P10+DC) ou sem células dendríticas (P10), ou apenas com células dendríticas (DC).

Foi possível verificar (Figura 4) que nos poços onde as células dendríticas estavam presentes houve maior proliferação das células totais do baço quando comparadas com os poços onde apenas o peptídeo foi adicionado. Essa proliferação foi significativa quando comparamos poços com células de baço dos animais controle, que não haviam entrado em contato com o peptídeo, com poços contendo células de animais que haviam sido expostos ao peptídeo *in vivo*. O controle de proliferação positiva foi feito com o mitógeno concanavalina A (ConA).

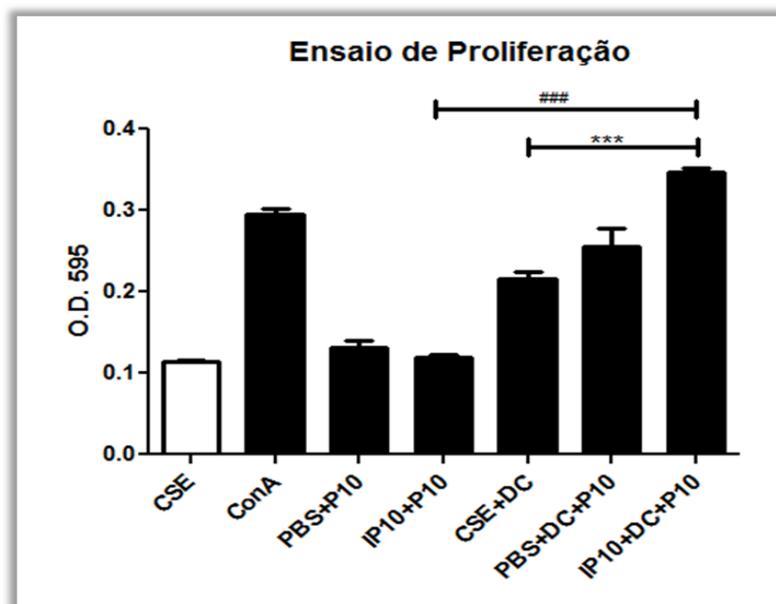


Figura 4 - Ensaio de proliferação celular. Foram utilizadas células totais de baço de animais controles, injetados apenas com PBS (PBS) e animais imunizados com $1,02 \times 10^{-2}$ mM do peptídeo P10 (IP10), após 72 h de estímulo com $2,55 \times 10^{-1}$ mM/ml do peptídeo (P10) ou o peptídeo ($2,55 \times 10^{-1}$ mM/ml) mais células dendríticas (+DC+P10). CSE - célula sem estímulo; ConA - mitógeno como controle positivo. Significância $p < 0,05$. *** Entre CSE+DC e IP10+DC+P10 e ### entre IP10+P10 e IP10+DC+P10. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

4.4 Contagem de unidade formadora de colônia

4.4.1 Grupo terapêutico 30 dias

Nesse grupo, os animais de cada grupo foram infectados por via intratraqueal, com 3×10^5 leveduras de Pb18 e após 30 dias de infecção, receberam duas doses de células dendríticas pulsadas com o peptídeo P10, a primeira no 31º e a segunda no 38º dia. Sete dias após a segunda dose os animais foram sacrificados e o baço, fígado e uma fração do pulmão foram retirados, macerados e plaqueados para contagem das unidades formadoras de colônia.

Os resultados, na Figura 5, obtidos com a contagem das unidades formadoras colônias indicaram que os grupos que receberam as células dendríticas pulsadas com o P10 apresentaram redução significativa da carga fúngica nos pulmões quando comparados com o grupo controle (infectados e não tratados). A diminuição da carga fúngica foi semelhante nos grupos tratados com as células dendríticas independente da via de administração. Não foram detectados fungos no baço e no fígado dos animais infectados.

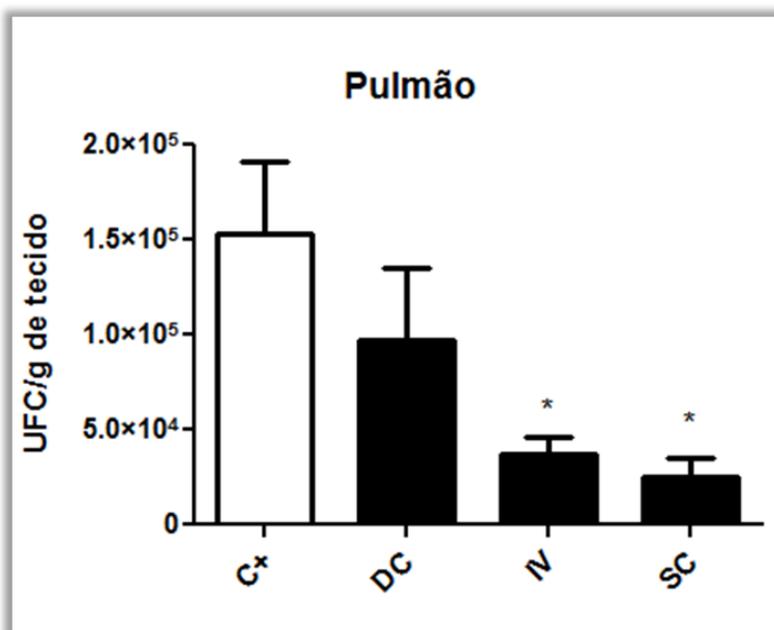


Figura 5 - Contagem de unidade formadora de colônia (UFC) nos pulmões dos animais do grupo terapêutico 30 dias. Os camundongos de cada grupo ($N = 5$) foram infectados por via intratraqueal (3×10^5 leveduras de Pb18) e após 30 dias de infecção receberam diferentes tratamentos. Grupo controle não foi tratado (C+) e os outros grupos receberam 2 doses da vacina, no 31º e 38º dias, sendo apenas células dendríticas (DC) ou células dendríticas pulsadas por 2 horas com P10, por diferentes vias - intravenosa (IV) ou subcutânea (SC). Sacrifício 7 dias após a última dose e uma fração do pulmão foi retirada para contagem de UFC. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o infectado não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey.

4.4.2 Grupo terapêutico 15 dias

Esse grupo de animais foi infectado com 3×10^5 leveduras de Pb18. Após 15 dias de infecção receberam apenas uma dose das células dendríticas e foram sacrificados sete dias após a administração da vacina. Foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia nas placas contendo o macerado de baço, fígado e pulmão. A determinação da carga fúngica, esquematizada Figura 6, mostrou que houve diminuição significativa das unidades formadoras de colônias nos camundongos tratados quando comparada com os animais do grupo controle positivo (infectados e não tratados), e a via de administração não foi capaz de alterar os resultados. Não foram detectados fungos no baço e no fígado dos animais infectados.

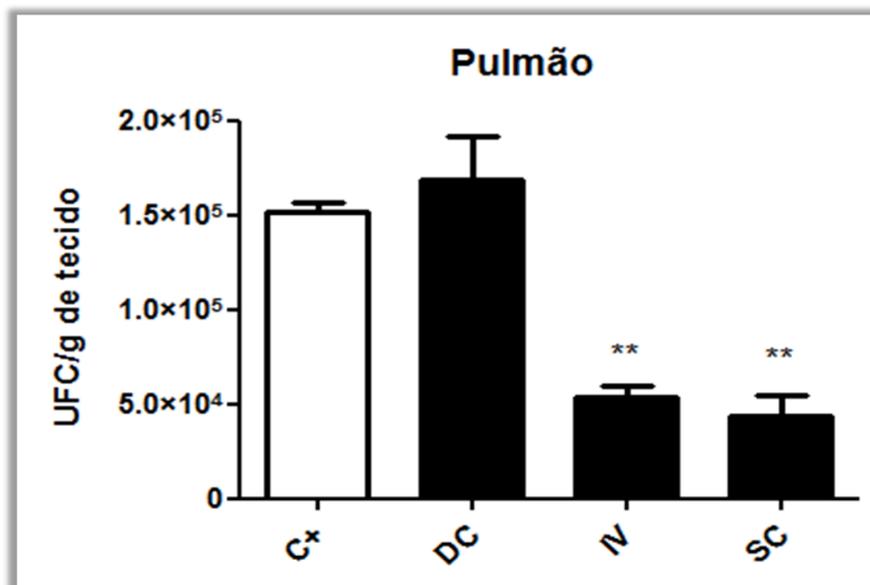


Figura 6 - Contagem de unidade formadora de colônia (UFC) nos pulmões dos animais do grupo terapêutico 15 dias. Todos os grupos (N = 5) foram infectados por via intratraqueal (3×10^5 leveduras de Pb18) e após 15 dias de infecção receberam diferentes tratamentos. Grupo controle não foi tratado (C+) e os outros grupos receberam uma dose da vacina, no 16º dia, sendo apenas células dendríticas (DC) ou células dendríticas pulsadas por 2 horas com P10, por diferentes vias - intravenosa (IV) ou subcutânea (SC). Animais foram sacrificados 7 dias após imunização e uma fração do pulmão foi retirada para contagem de UFC. ** Significância $p < 0,05$ quando comparado com o infectado não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

4.4.3 Grupo profilático 1 dia

Nesse grupo foi realizada uma abordagem diferente. Os animais dos grupos tratados receberam primeiro a vacina contendo as células pulsadas com o peptídeo (grupo IV e SC) ou células sem estímulo do P10 (grupo DC). Após 24 horas esses grupos, juntamente com o grupo controle positivo (C+), foram infectados com o isolado Pb18 e foram sacrificados após 30 dias de infecção. Foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias no baço, fígado e pulmão desses animais.

A Figura 7 mostra os resultados obtidos que indicaram redução significativa da carga fúngica nos pulmões apenas dos animais do grupo que receberam as células dendríticas pulsadas com o P10 através da via subcutânea, quando comparados com os animais do grupo controle positivo (infectados e não tratados). Nos animais que receberam o tratamento profilático pela via intravenosa a quantidade de leveduras nos pulmões foi semelhante aos grupos controles (somente infectados ou infectados e que receberam apenas células dendríticas). Não foram detectados fungos no baço e no fígado dos animais infectados.

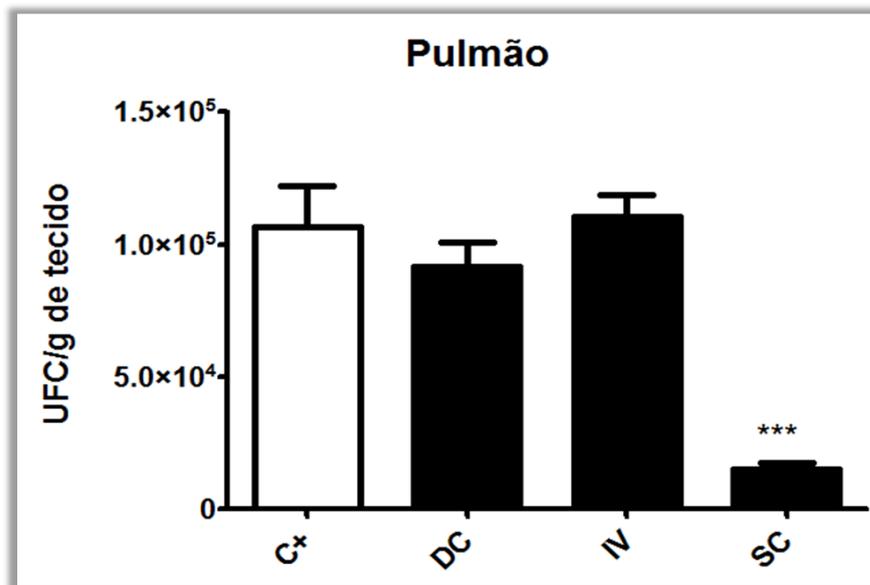


Figura 7 - Contagem de unidade formadora de colônia (UFC) nos pulmões dos animais do grupo profilático 1 dia. Os camundongos de cada grupo (N = 5), exceto o grupo controle (C+, infectado e não tratado), foram imunizados com a vacina. O grupo DC recebeu apenas as células dendríticas na base da cauda, os grupos IV e SC receberam as células pulsadas por 2 horas com P10, sendo essas imunizações por diferentes vias: subcutânea no grupo SC e intravenosa no grupo IV. Um dia após a imunização todos os grupos, incluindo o controle, foram infectados por via intratraqueal (3×10^5 leveduras de Pb18) e após 30 dias de infecção foram sacrificados. Uma fração do pulmão foi retirada para contagem de UFC. Significância $p < 0,05$. ** grupo SC comparado com o grupo C +, *** grupo SC comparado com o grupo IV. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

4.5 Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas foi realizada para verificar qual o padrão de resposta presente em cada tipo de protocolo. Para isso, foram dosadas as citocinas IL-12 e IFN- γ , que predominam em respostas do tipo Th1 e as citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10 (padrão Th2) no sobrenadante do macerado de uma fração do pulmão dos animais de cada grupo.

4.5.1 Grupo terapêutico 30 dias

Nesse protocolo vacinal, os animais apresentaram um aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias, esquematizado na Figura 8. Os grupos que receberam a vacina contendo as células dendríticas e o P10, independente da via utilizada, apresentaram aumento significativo tanto de IFN- γ quanto de IL-12 quando comparados com o grupo controle infectado e não tratado.

As citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, também foram analisadas e estão apresentadas em gráficos da na Figura 9. Nos grupos vacinados com as células dendríticas pulsadas com o peptídeo houve redução significativa da citocina IL-10 quando comparados com o grupo controle não infectado. Em relação a citocina IL-4, não foi possível detectá-la nos grupos vacinados. Nos outros três grupos: controle positivo somente infectado, no que recebeu somente as células dendríticas e no grupo não tratado e não infectado, os níveis dessa citocina ficaram entre 70 e 150 pg/g de tecido.

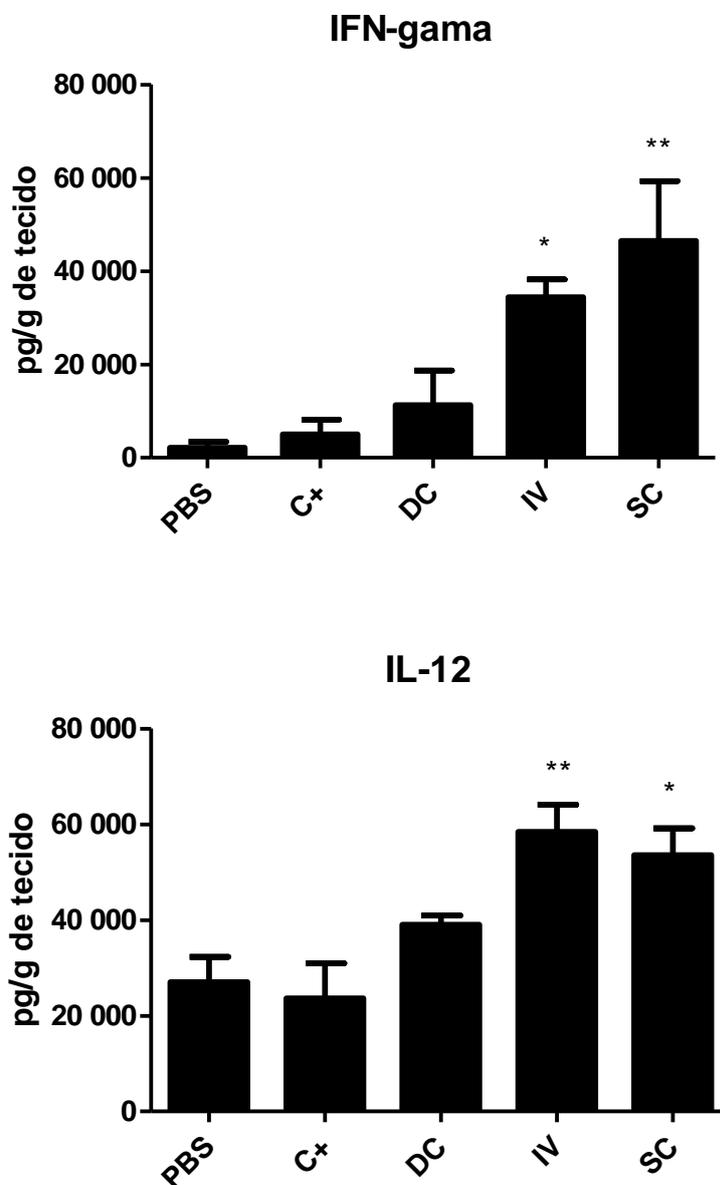


Figura 8 - Dosagem de citocinas IFN- γ e IL-12 no sobrenadante do macerado dos pulmões do grupo terapêutico 30 dias. Os animais de cada grupo (N=5) foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 30 dias receberam diferentes tratamentos (duas doses com intervalo de sete dias), o grupo DC recebeu apenas células dendríticas e os grupos IV e SC receberam as células dendríticas pulsadas com o P10 por diferentes vias, intravenosa e subcutânea, respectivamente. Animais foram sacrificados sete dias após a administração da última dose da vacina. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle infectado e não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

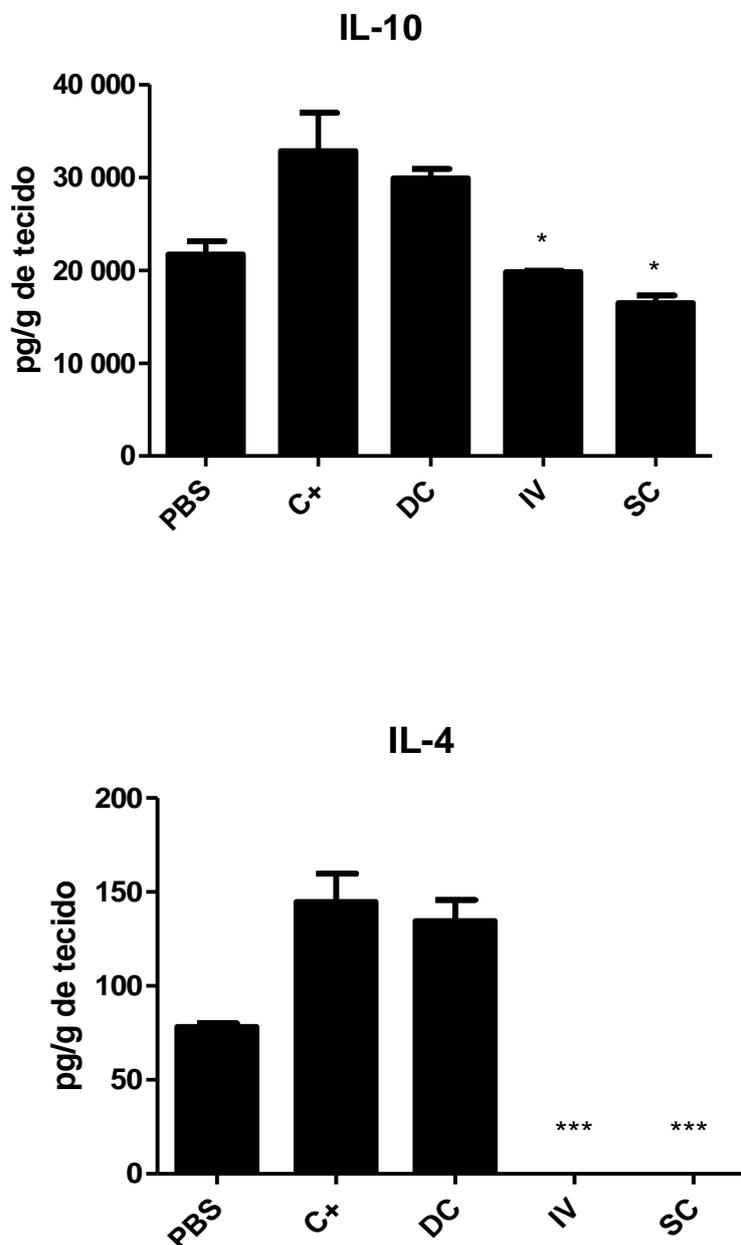


Figura 9 - Dosagem de citocinas IL-10 e IL-4 no sobrenadante do macerado dos pulmões do grupo terapêutico 30 dias. Os animais de cada grupo (N=5) foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 30 dias receberam diferentes tratamentos (duas doses no intervalo de sete dias), o grupo DC recebeu apenas células dendríticas e os grupos IV e SC receberam células dendríticas pulsadas com P10 por diferentes vias, intravenosa e subcutânea respectivamente. Animais foram sacrificados sete dias após a administração da última dose da vacina. * Significância $p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle infectado e não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

4.5.2 Grupo terapêutico 15 dias

As citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ e IL-12, foram dosadas em todos os grupos desse protocolo (Figura 10). Os níveis detectados da citocina IFN- γ nos grupos vacinados com as células dendríticas pulsadas com o peptídeo foram significativamente maiores do que o encontrado no grupo controle positivo (infectado e não tratado). O aumento da IL-12 foi significativo somente no grupo que recebeu a vacina pela via subcutânea, quando comparado com o controle positivo. Com relação às citocinas IL-4 e IL-10, os grupos vacinados, independente da via de administração, apresentaram níveis menores do que o encontrado no controle infectado e não tratado (Figura 11).

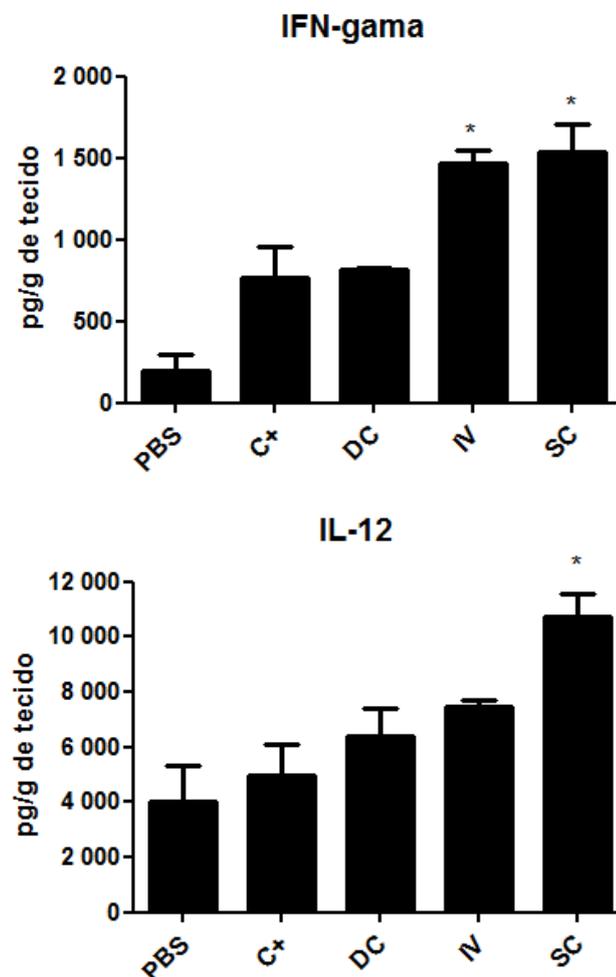


Figura 10 - Dosagem de citocinas IFN- γ e IL-12 no sobrenadante do macerado dos pulmões do grupo terapêutico 15 dias. Os animais de cada grupo (N=5) foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 15 dias receberam diferentes tratamentos (dose única), o grupo DC recebeu apenas células dendríticas e os grupos IV e SC receberam as células dendríticas pulsadas com P10 por diferentes vias, intravenosa e subcutânea, respectivamente. Animais foram sacrificados sete dias após a administração da vacina. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle infectado e não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

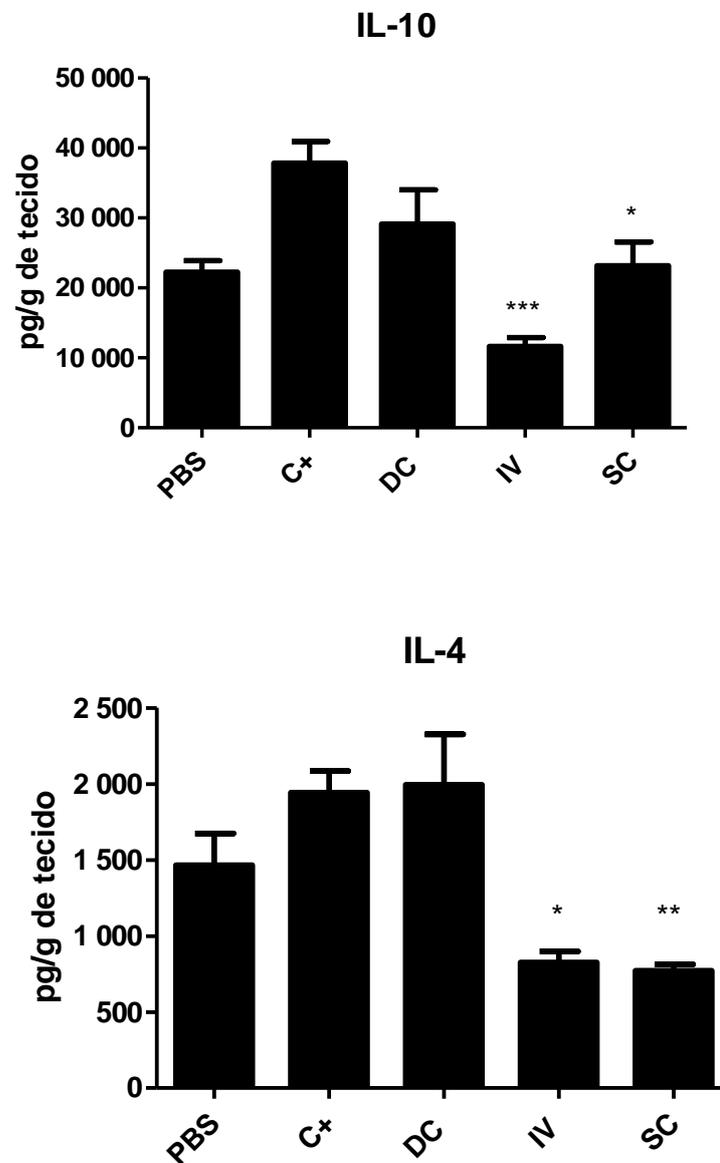


Figura 11 - Dosagem de citocinas IL-4 e IL-10 no sobrenadante do macerado dos pulmões do grupo terapêutico 15 dias. Os animais de cada grupo (N=5) foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 15 dias receberam diferentes tratamentos (dose única), o grupo DC recebeu apenas células dendríticas e os grupos IV e SC receberam as células dendríticas pulsadas com P10 por diferentes vias, intravenosa e subcutânea, respectivamente. Animais foram sacrificados sete dias após a administração da vacina. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle infectado e não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

4.5.3 Grupo profilático 1 dia

O grupo que recebeu a vacina contendo as células dendríticas pulsadas com P10 administrada por via subcutânea obteve aumento significativo nos níveis das duas citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ e IL-12 (Figura 12), além de diminuição significativa da citocina antiinflamatória IL-10 (Figura 13), isso quando comparado com o controle positivo. O grupo que recebeu a mesma vacina por via intravenosa, não obteve os mesmos resultados, apenas sendo significativa a diminuição de IL-10. A diminuição de IL-4 não foi significativa em nenhum dos grupos analisados (Figura 13).

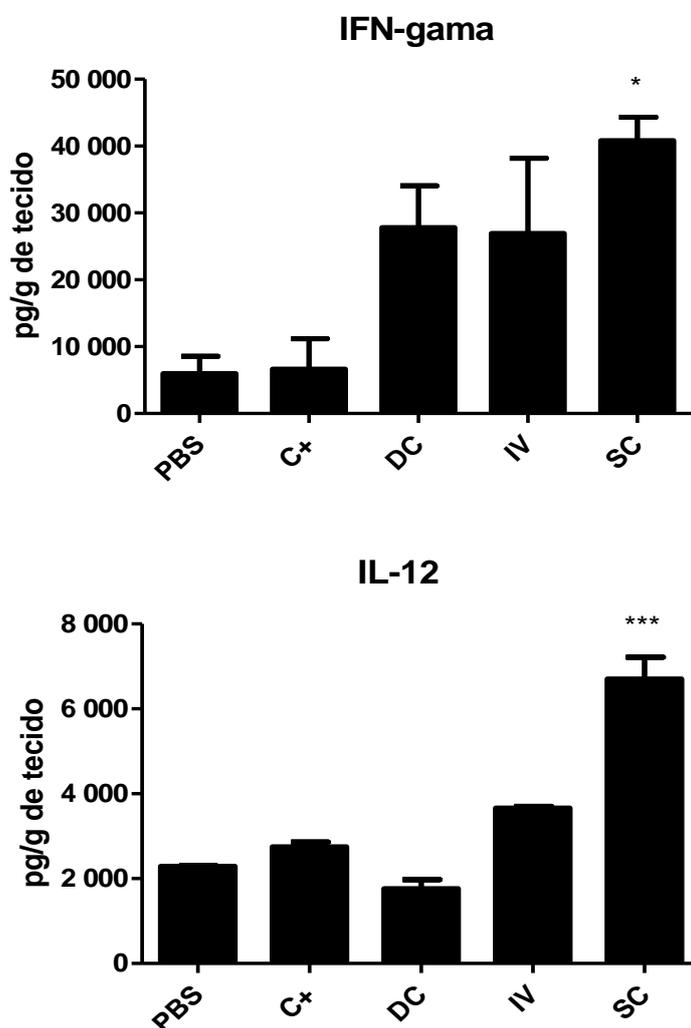


Figura 12 - Dosagem de citocinas IFN- γ e IL-12 no sobrenadante do macerado dos pulmões do grupo profilático 1 dia. Os animais de cada grupo (N=5) receberam diferentes tratamentos (dose única), o grupo DC recebeu apenas células dendríticas e os grupos IV e SC receberam as células dendríticas pulsadas com P10 por diferentes vias, intravenosa e subcutânea, respectivamente. Um dia após a imunização, os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras e sacrificados trinta dias depois. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle infectado e não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

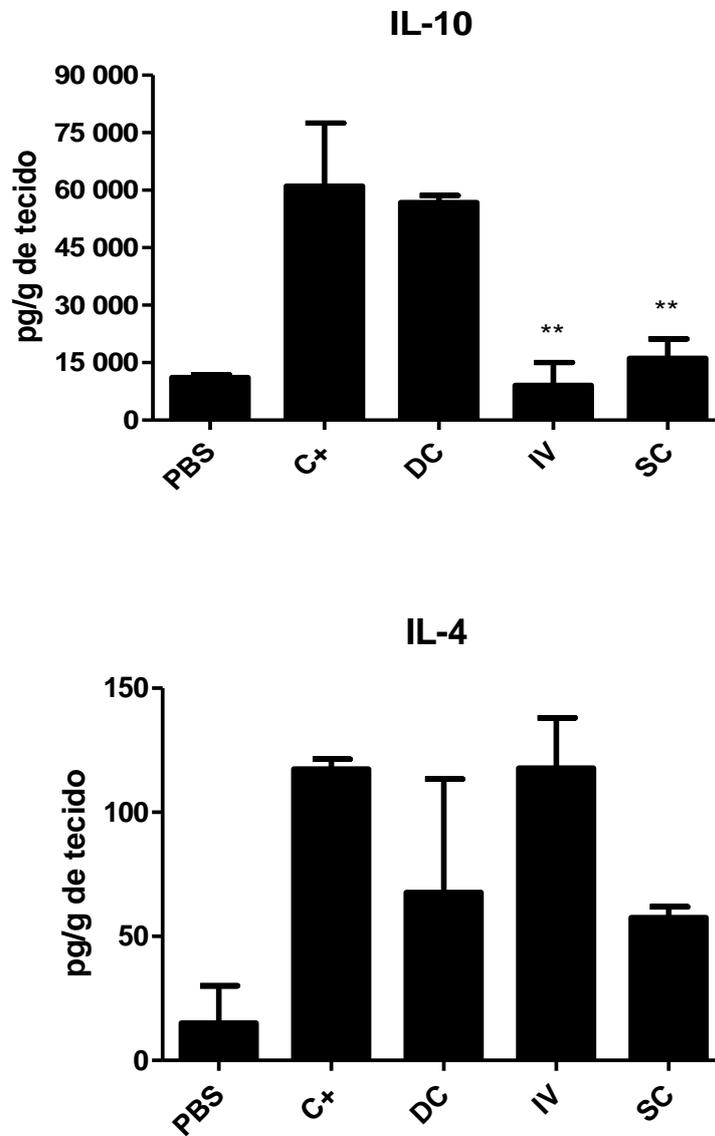
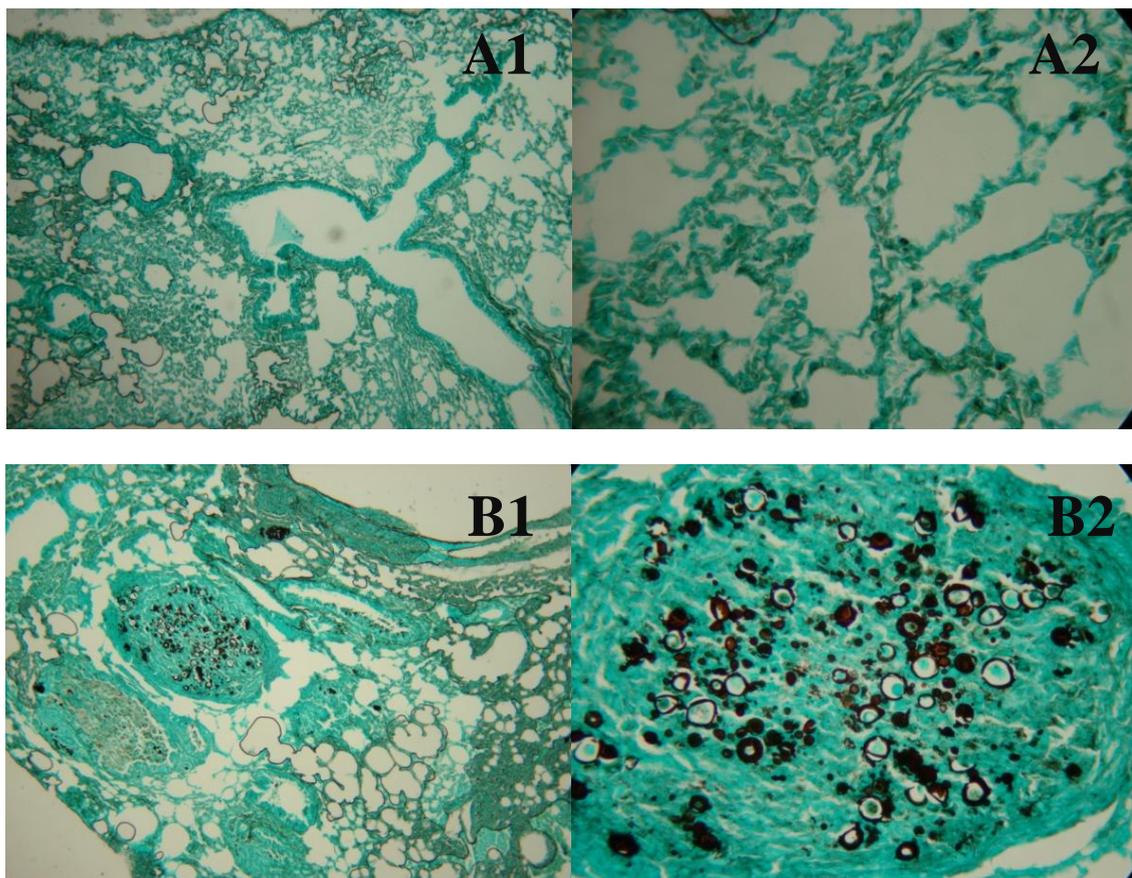


Figura 13 - Dosagem de citocinas IL-10 e IL-4 no sobrenadante do macerado de pulmão do grupo profilático 1 dia. Os animais de cada grupo (N=5) receberam diferentes tratamentos (dose única), o grupo DC recebeu apenas células dendríticas e os grupos IV e SC receberam as células dendríticas pulsadas com P10 por diferentes vias, intravenosa e subcutânea, respectivamente. Um dia após, os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras e sacrificados trinta dias depois. * Significância $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle infectado e não tratado (C+). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

4.6 Histopatológicos

4.6.1 Grupo terapêutico 30 dias

Observa-se, na Figura 14, comparação histopatológica de lâminas coradas pelo método de Gomori-Grocott entre os grupos estudados. Os animais do grupo controle (figuras B1 e B2), somente infectados, apresentaram um parênquima pulmonar inflamado e muito comprometido, com granulomas contendo muitas células fúngicas em seu interior, o mesmo ocorrendo com o grupo infectado e que recebeu apenas as células dendríticas (figuras C1 e C2). Os pulmões dos animais tratados com as células pulsadas com o peptídeo, tanto pela via intravenosa (figuras D1 e D2) quanto subcutânea (figuras E1 e E2) apresentaram o parênquima menos afetado, com menor grau de inflamação, apenas alguns granulomas contendo poucas células fúngicas viáveis.



Continua

Conclusão

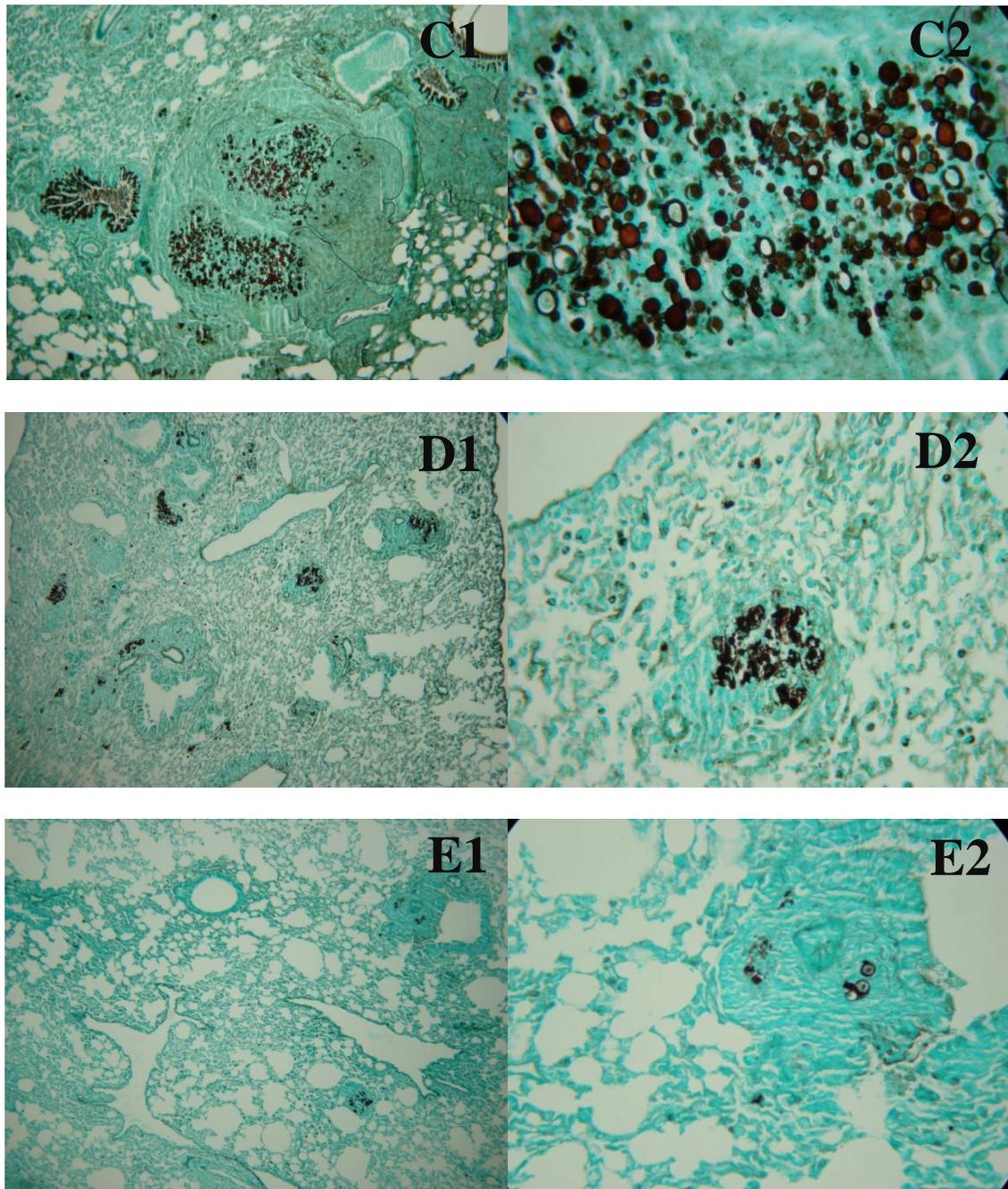
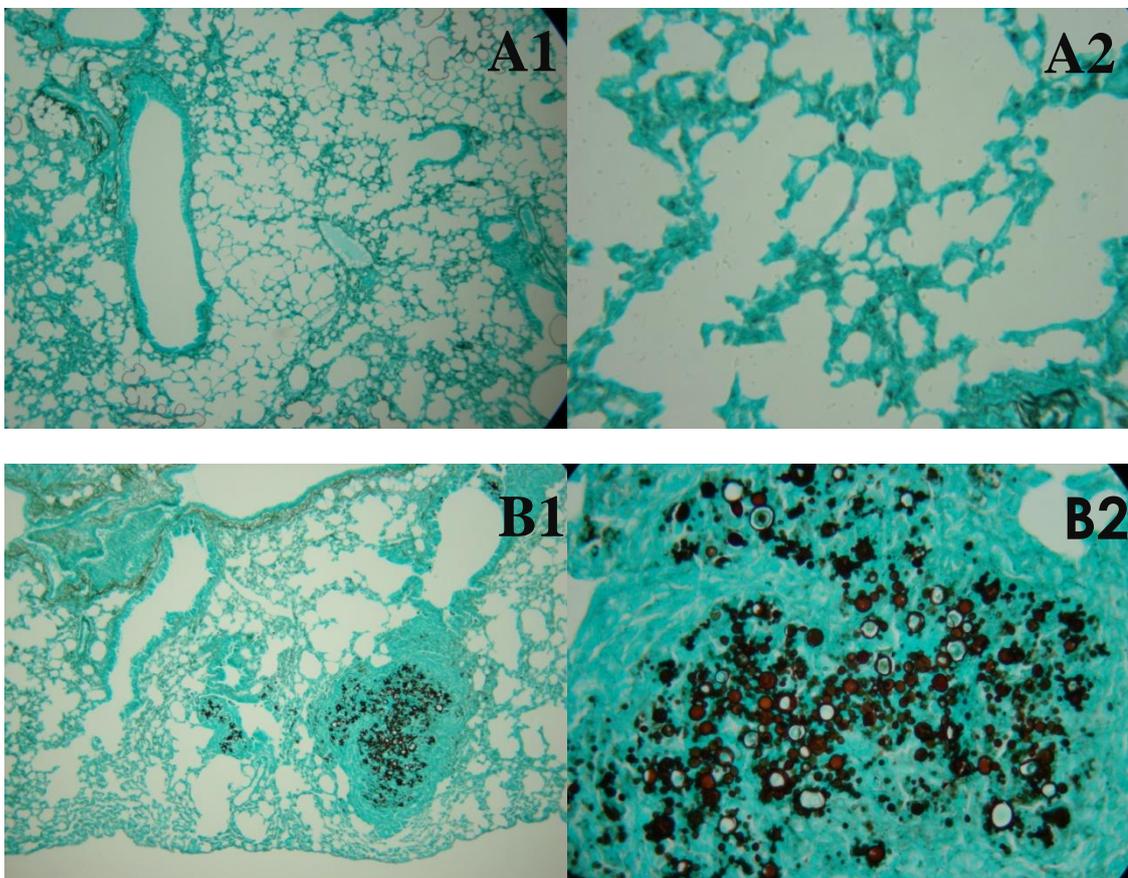


Figura 14 - Exame histopatológico de uma fração de pulmão dos animais do grupo terapêutico 30 dias. Os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 30 dias esses receberam diferentes tratamentos que consistiam em duas doses com intervalo de sete dias. Foram sacrificados sete dias após a segunda dose. A. animais não infectados; B. animais infectados e não tratados; C. animais que receberam apenas células dendríticas; animais que receberam células dendríticas pulsadas com o peptídeo por diferentes vias: D. intravenosa e E. subcutânea. As figuras com número 1 (A1, B1, C1, D1 e E1) mostram aumento de 100 vezes e as figuras com número 2 (A2, B2, C2, D2 e E2) mostram aumento de 400 vezes, no microscópio óptico (Nikon Eclipse E200). Lâminas coradas pelo método de Gomori-Grocott.

4.6.2 Grupo terapêutico 15 dias

Nesse grupo, um padrão semelhante ao que ocorreu com o grupo terapêutico 30 dias foi observado (Figura 15). No histopatológico do grupo controle positivo (figuras B1 e B2), somente infectado, apesar de apresentarem poucos granulomas, devido ao curto período de infecção (15 dias), apresentavam um número elevado de leveduras viáveis. Os grupos tratados com a vacina de células dendríticas pulsadas com o peptídeo (figuras D1 e D2 e E1 e E2) apresentaram um parênquima mais conservado e, apesar de ainda encontrarmos granulomas contendo células fúngicas, poucas dessas células parecem viáveis.



Continua

Conclusão

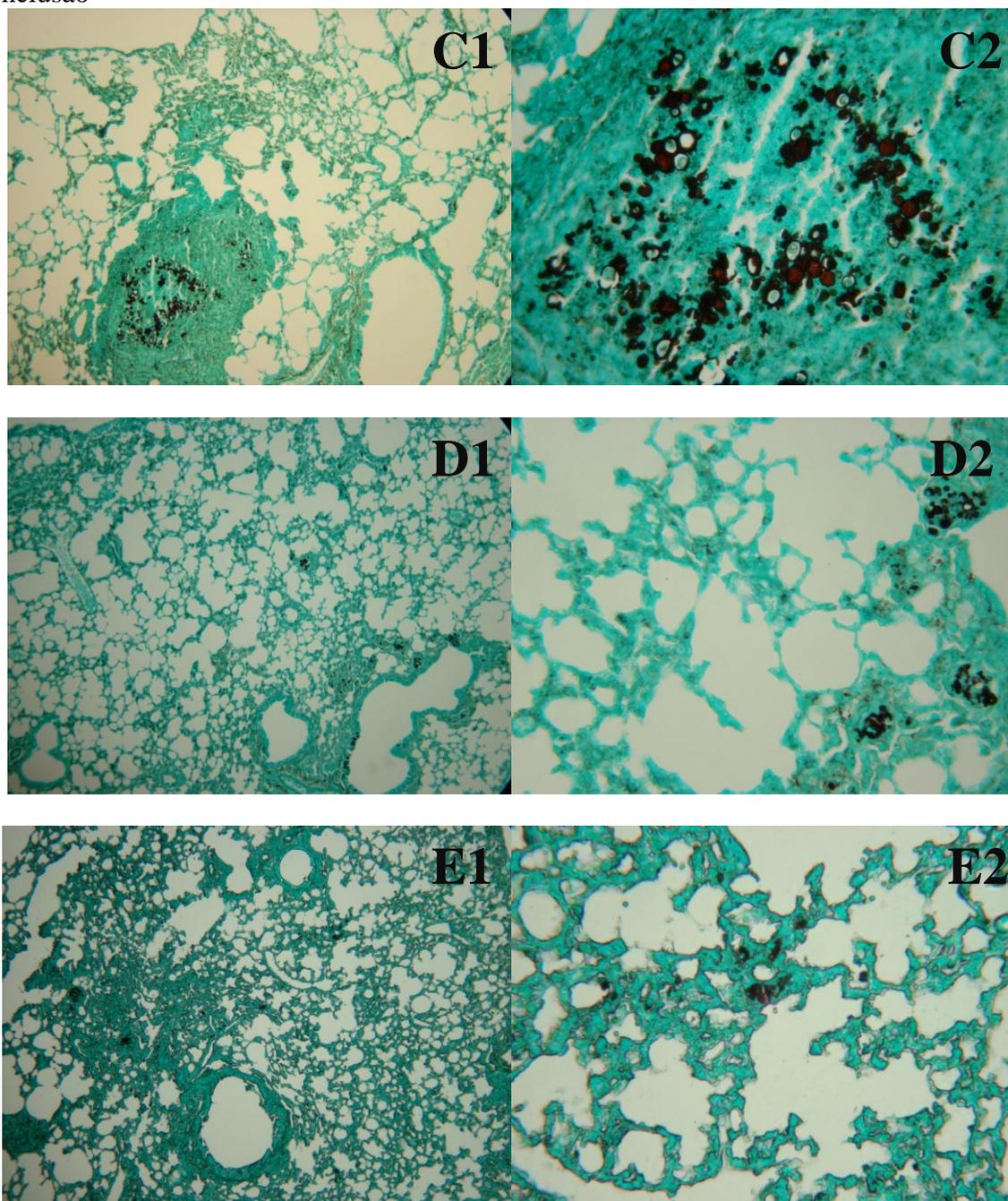
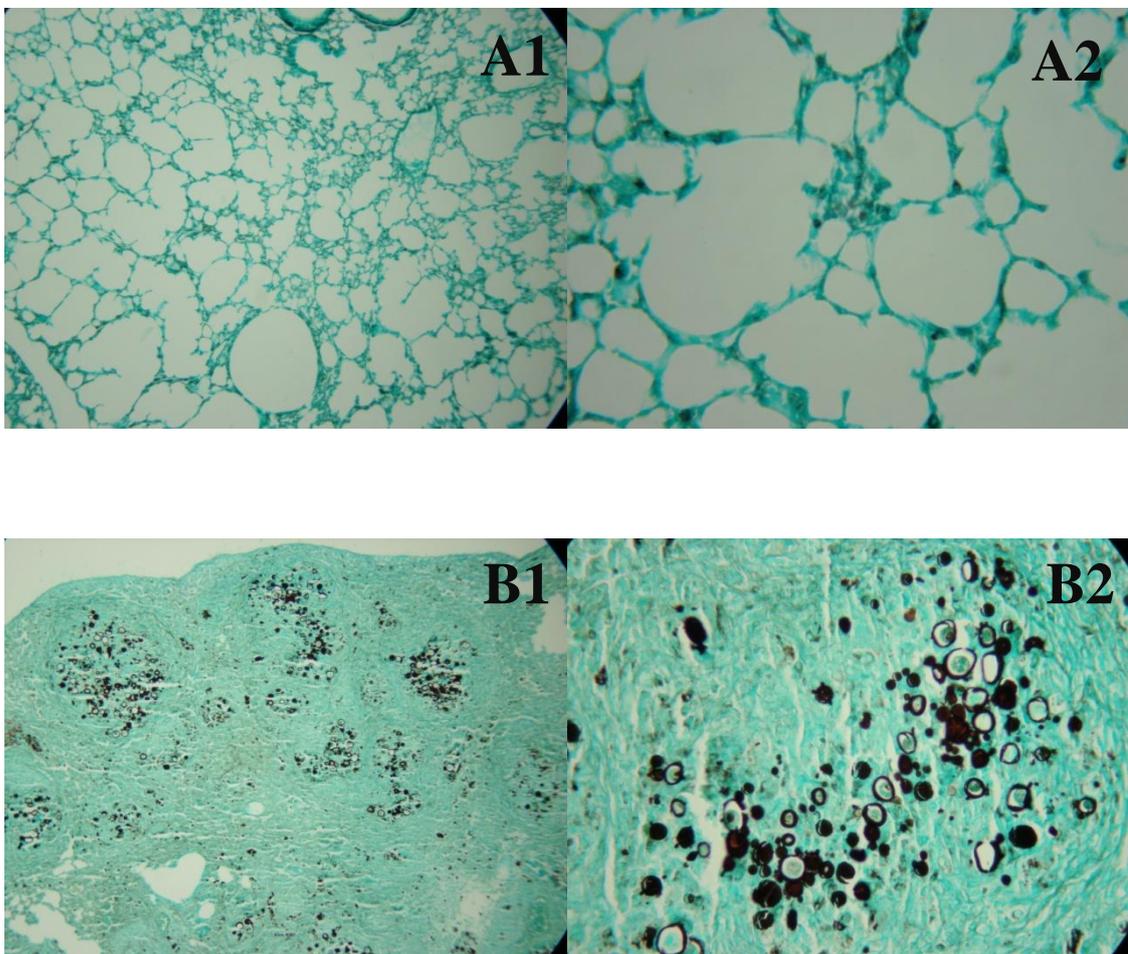


Figura 15 - Exame histopatológico da fração de pulmão dos animais do grupo terapêutico 15 dias. Os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 15 dias esses receberam diferentes tratamentos consistindo em dose única. O sacrifício ocorreu sete dias após a vacinação. *A.* animais não infectados; *B.* animais infectados e não tratados; *C.* animais que receberam apenas células dendríticas; animais que receberam células dendríticas pulsadas com o peptídeo por diferentes vias: *D.* intravenosa e *E.* subcutânea. As figuras com número 1 (*A1*, *B1*, *C1*, *D1* e *E1*) mostram aumento de 100 vezes e as figuras com número 2 (*A2*, *B2*, *C2*, *D2* e *E2*) mostram aumento de 400 vezes, no microscópio óptico (Nikon Eclipse E200). Lâminas coradas pelo método Gomori-Grocott.

4.6.3 Grupo profilático 1 dia

Nesse último grupo, Figura 16, observamos uma diferença marcante entre os grupos que receberam a vacina. O histopatológico do grupo que recebeu as células pulsadas por via intravenosa (figura D1 e D2), mostra um parênquima bastante comprometido, com grandes áreas de inflamação e granulomas contendo muitas células fúngicas. O grupo que recebeu a mesma vacina, mas via subcutânea (figura E1 e E2), apresentou um tecido pulmonar bem conservado com poucos granulomas e menor grau de inflamação, além de poucas leveduras viáveis.



Continua

Conclusão

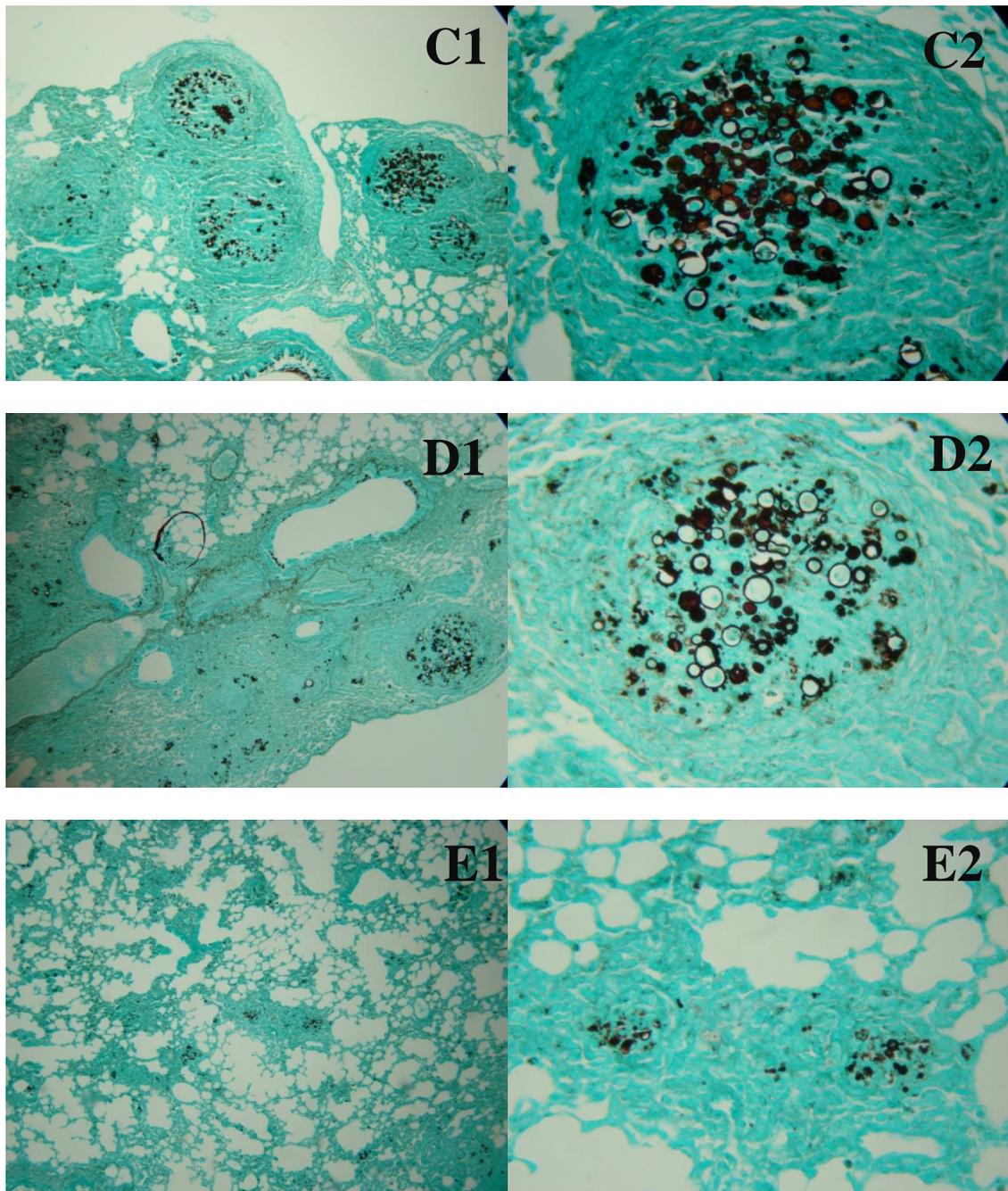


Figura 16 - Exame histopatológico da fração de pulmão dos animais do grupo profilático 1 dia. Os animais receberam diferentes tratamentos um dia antes de serem infectados e após 30 dias foram sacrificados. *A.* animais não infectados; *B.* animais infectados e não tratados; *C.* animais que receberam apenas células dendríticas; e animais que receberam células dendríticas pulsadas com o peptídeo por diferentes vias: *D.* intravenosa e *E.* subcutânea. As figuras com número 1 (*A1*, *B1*, *C1*, *D1* e *E1*) mostram aumento de 100 vezes e as figuras com número 2 (*A2*, *B2*, *C2*, *D2* e *E2*) mostram aumento de 400 vezes, no microscópio óptico (Nikon Eclipse E200). Lâminas coradas pelo método de Gomori-Grocott.

5 DISCUSSÃO

A paracoccidiodomicose é uma doença que requer um tratamento longo e desgastante, tanto para o paciente quanto para o sistema público de saúde. As drogas de escolha clínica apesar de ainda eficazes, como a combinação sulfametoxazol-trimetoprim ou a anfotericina B, possuem desvantagens como necessidade de longos períodos de tratamento e efeitos colaterais que podem ser graves, como nefrotoxicidade no caso da anfotericina B (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; MARTINEZ, 2004).

O peptídeo P10 é um forte candidato para o controle da paracoccidiodomicose. Estudos mostraram sua eficácia tanto na diminuição da carga fúngica, quando administrado com CFA, quanto no auxílio a terapêutica empregada no tratamento da doença em modelos experimentais (TABORDA et al., 1998; MARQUES et al., 2008). E, esse peptídeo tem sido utilizado em outros estudos empregando diferentes estratégias, como vacinas de DNA, utilizando a flagelina como adjuvante ou aprisionado em nanopartículas de PLGA [poli(ácido láctico-co-glicólico)], e apresentaram resultados muito promissores (RITTNER, 2008; BRAGA et al., 2009; AMARAL et al., 2010).

A maioria dos trabalhos que utilizam peptídeos como subunidades para vacinas são para o tratamento de diversos tipos de cânceres, mas existem estudos com ótimos resultados utilizando essas vacinas contra *Streptococcus pyogenes*, malária, doença de Chagas e criptococose (PLOTKIN, 2003; PANDEY et al. 2009; AUDRAN et al., 2009; BUA et al., 1991; DATTA et al. 2008;). A grande dificuldade que se tem na utilização de peptídeos é a necessidade de torná-los mais imunogênicos co-administrando-os com adjuvantes fortes, como ligantes de receptores *Toll-like* (NAVA-PARADA et al., 2007).

A procura por novos adjuvantes é um importante ponto para a aquisição de novas vacinas eficazes. Para uso em humanos o alúmen tem sido utilizado há anos, mas sua eficácia é limitada, pois promove principalmente reposta do tipo Th2 com produção de anticorpos, o que não é o procurado para o combate da maioria das doenças fúngicas incluindo a PCM (GUPTA e SIBER, 1995; DEEPE, 1997; CUTLER; DEEPE; KLEIN, 2007).

As células dendríticas possuem potencial para serem utilizadas como adjuvante devido suas características de células profissionais apresentadoras de antígenos sendo, dentre essas, as mais potentes em estimular respostas imunes. As células dendríticas são capazes de ativar células T *naive* apresentando antígenos peptídicos através de MHC-II, além de possuírem

moléculas coestimulatórias que são necessárias para a ativação das células T (BANCHEREAU, et al., 2000).

Quando se utilizam antígenos protéicos, essas proteínas devem inicialmente penetrar na célula dendrítica e serem processadas para poderem ser apresentadas como peptídeos ligados as moléculas de MHC-II, e quando se utiliza peptídeos, esses não precisam necessariamente penetrar na célula para serem apresentados; eles podem se ligar diretamente à moléculas MHC-II “vazias” que estão presentes na superfície das células dendríticas. Essas moléculas de superfície são capazes de capturar peptídeos diretamente do meio extracelular e apresentá-los para linfócitos T específicos (SANTAMBROGIO et al., 1999).

Na formulação da vacina utilizada nesse trabalho o peptídeo foi incubado com as células dendríticas por duas horas e, a capacidade de moléculas de MHC-II na superfície acoplar peptídeos do meio externo sem a necessidade de processá-los no interior das células, permite que o peptídeo não seja degradado dentro da célula. Tal processo poderia levar a perda de algum trecho importante para a ativação das células T *naive* ou mesmo a reativação das células T que anteriormente entraram em contato ou com o fungo ou com antígenos extracelulares, como a gp43.

Outro estudo utilizando camundongos transgênicos que expressam HLA-DR4 (antígeno de histocompatibilidade humano) foi realizado e os autores observaram que células dendríticas imaturas podem expressar essas moléculas vazias em suas superfícies assim como acontece com MHC em camundongos (CARVEN et al., 2003). Isso leva a crer que as células dendríticas humanas devem possuir essas moléculas vazias em suas superfícies facilitando a ligação direta de peptídeos extracelulares, o que seria uma vantagem no desenvolvimento de uma formulação de vacina para humanos segundo a técnica utilizada nesse trabalho.

Outra vantagem na utilização das células dendríticas nessa abordagem é o fato dessas células serem um adjuvante natural o que é importante devido a falta de novos adjuvantes aprovados para uso em humanos no mercado. E, seu uso diminui a quantidade de antígeno a ser administrada.

Os trabalhos anteriores feitos com P10 esse utilizaram a concentração de $1,02 \times 10^{-2}$ mM por dose e coadministrado com CFA, adjuvante cuja autorização se estende apenas para animais de experimentação excluindo o uso em humano. Nesse trabalho contamos com os benefícios de não ser utilizado CFA e a dose de escolha do P10 para pulsar as células dendríticas, $2,55 \times 10^{-1}$ mM/ml, foi menor do que a utilizada em outras abordagens, o que em

termos financeiros é uma grande vantagem, pois a produção de peptídeos sintéticos tem um alto custo.

Na curva para escolha da concentração do peptídeo utilizamos três doses diferentes, $2,55 \times 10^{-1}$, $5,1 \times 10^{-1}$ e $7,65 \times 10^{-1}$ mM/ml do P10 em ensaio de linfoproliferação com células de baço de camundongos imunizados com P10 ou PBS. Não obtivemos nenhuma diferença significativa na proliferação dessas células com as diferentes concentrações, e por isso utilizamos a menor concentração que foi capaz de ativar a proliferação celular ($2,55 \times 10^{-1}$ mM/ml).

Em ensaios de proliferação celular as células dendríticas são potentes estimuladoras de células T, sendo necessárias poucas células para provocar forte resposta. Uma única célula dendrítica é capaz de ativar de 100 a 3000 células T (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998).

Essas células são as mais potentes células apresentadoras para estimulação de células T antígeno-específicas, tanto utilizando antígenos solúveis quanto particulados (NI e O'NEILL, 1996).

No ensaio de linfoproliferação realizado nesse trabalho ficou evidente o poder de estimulação celular das células dendríticas. Utilizamos células de baço de camundongos que haviam sido imunizados com o peptídeo, sem adição de qualquer outro adjuvante, para medir a proliferação dessa população quando em contato novamente com o peptídeo *in vitro*. Ficou claro pelos resultados obtidos que a concentração utilizada do peptídeo ($2,55 \times 10^{-1}$ mM) não foi suficiente para induzir proliferação celular. Mas, quando essa mesma concentração de peptídeo foi plaqueada juntamente as células dendríticas, as células de baço dos camundongos que haviam entrado em contato com o peptídeo anteriormente foram ativadas e sofreram proliferação celular significativa e visível, com numerosos aglomerados celulares evidentes.

Outra observação interessante foi a de que células de baço de camundongos que haviam sido inoculados somente com PBS quando cultivados com as células dendríticas juntamente ao peptídeo também apresentavam certo grau de proliferação. Esses resultados evidenciam o papel central das células dendríticas como responsáveis pela apresentação de antígenos e iniciação de resposta celular, com ativação e proliferação, tanto em células primadas quando em células T *naive*.

Em 1978, Steinman e Witmer mostraram como as células dendríticas são importantes nessa primeira apresentação, o grupo observou que quando se utiliza células dendríticas purificadas como estimuladoras da reação leucocitária mista (MLR) essas são de 100 a 300 vezes mais potentes do que células de baço não fracionadas e que a eliminação das células

dendríticas de aloenxertos resultava na sobrevivência do enxerto. E, dentre as células que podem apresentar antígenos para células T *naive*, como macrófagos, células B e células dendríticas, essas últimas são as mais eficientes em iniciar a diferenciação de células T CD4⁺ e CD8⁺ (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998).

Como não existem muitos estudos utilizando células dendríticas no tratamento da PCM, nos baseamos em diversos estudos para elaborar protocolos de vacinação. Muitos trabalhos realizados em modelo experimental na PCM, inclusive em nosso laboratório, aguarda-se trinta dias de infecção para dar início ao tratamento, quando se estuda abordagens terapêuticas, pois esse é o período considerado suficiente para instalação da doença.

Aplicamos dois tempos de infecção, 15 e 30 dias da instalação da infecção antes de iniciar os tratamentos. Uma vez que desconhecíamos se as células dendríticas seriam capazes de intervir no estágio onde a infecção já houvesse se estabelecido, apresentando formação de granulomas, utilizamos o protocolo terapêutico com apenas quinze dias de infecção, para estudar a resposta das células dendríticas pulsadas com o peptídeo quando a infecção ainda estava em curso, o que hipoteticamente facilitaria a intervenção das células dendríticas.

Metodologias profiláticas não são apropriadas para doenças fúngicas como a PCM e tão pouco para vacinas que utilizam células dendríticas, já que não é viável imunizar populações inteiras contra um patógeno que não apresenta alta taxa de mortalidade, e também seria inviável a elaboração da vacina, isso porque seria necessário retirar sangue de todos os indivíduos que seriam imunizados para a diferenciação a partir de monócitos em células dendríticas *in vitro* seguida de incubação com o antígeno e posterior inoculação das células pulsadas nos pacientes.

Abordagem profilática somente seria viável se fosse aplicada apenas em indivíduos que são considerados como pertencentes a grupos de risco ou que residem áreas endêmicas. Apesar disso, um terceiro protocolo utilizando abordagem profilática foi realizado com objetivo de observar se as células dendríticas seriam capazes de apresentar o peptídeo para as células T e primá-las, para que no momento em que esses animais entrassem em contato com o patógeno, conseguissem responder mais rapidamente evitando o estabelecimento da doença.

Alguns trabalhos mostram que a imunização com células dendríticas no coxim plantar resulta no aumento de células nos linfonodos drenantes um dia após a injeção com essas células, à medida que o número máximo de células nos linfonodos é atingido entre o segundo e terceiro dia pós-imunização (MARTÍN-FONTECHA et al., 2003). Outro trabalho mostra que a migração de células dendríticas inoculadas s.c. no coxim plantar para os linfonodos

poplíteos ocorre imediatamente e em três horas elas se encontram fora das áreas de células T e em 24 horas as células dendríticas atingem as áreas ricas em células T (AUSTYN et al., 1988).

Foram testadas diferentes vias de administração, uma vez que diversos trabalhos apontam para diferenças nos resultados dependendo da via escolhida. Os resultados obtidos nos protocolos terapêuticos, nos quais os camundongos foram primeiramente infectados e posteriormente tratados com as células pulsadas com o peptídeo, tanto no grupo terapêutico 30 dias (trinta dias para estabilização da doença e duas doses da vacina, com intervalos de sete dias) quanto no grupo terapêutico 15 dias (quinze dias de infecção e dose única da vacina no 16º dia) foram muito semelhantes.

Ambas as vias, subcutânea e intravenosa, foram capazes de induzirem diminuição significativa da carga fúngica nos pulmões dos camundongos, o que mostra que as células foram capazes de ativar os linfócitos e auxiliarem na eliminação das células fúngicas, independente da via de administração. O grupo profilático, no qual os animais inicialmente recebiam a vacina e 24 horas após eram infectados com leveduras de *P. brasiliensis*, apresentou diferença marcante nas duas.

No protocolo profilático o grupo que recebeu as células pulsadas através da via subcutânea obteve redução drástica da carga fúngica, contudo o grupo que recebeu as mesmas células pela via intravenosa apresentaram carga fúngica pulmonar semelhante à do controle infectado e não tratado. Podemos inferir que na abordagem profilática, no grupo que recebeu a vacina pela via s.c., as células dendríticas migraram para os linfonodos drenantes ativando as células T *naive* e iniciando a resposta imunológica de maior magnitude, o que não ocorreu nos camundongos que receberam as células pela via i.v., que resulta na migração para pulmões, fígado e baço, não sendo capaz de montar resposta efetiva contra a posterior infecção com *P. brasiliensis*.

Acreditamos que por migrar preferencialmente para os pulmões as células dendríticas inoculadas via i.v. podem ter resultado em certa tolerância para o antígeno e conseqüentemente deixando o organismo susceptível a posterior infecção. Estudos experimentais mostram que, quando em estado de repouso (*steady-state conditions*), o encontro com antígenos não patogênicos, como proteínas inertes, ativa a resposta supressora antígeno-específica de células T o que protege contra a subsequente sensibilização contra a substância alergênica pela indução da tolerância imunológica (HOLT e MCMENAMIN, 1989).

Quando a via i.v. foi utilizada na abordagem terapêutica ela resultou na resposta efetiva contra o fungo, pois quanto as células dendríticas pulsadas migram para os pulmões encontram nesse órgão um ambiente inflamatório que ajuda em sua ativação, desencadeando forte resposta imune.

Nossos resultados vão de acordo com estudos que utilizaram diferentes vias de administração para vacinas com células dendríticas, foi demonstrado que essas células quando administradas por via subcutânea migram preferencialmente para os linfonodos drenantes, enquanto quando são administradas pela via intravenosa há acúmulo no fígado, nos pulmões e no baço. Mostraram que as células dendríticas, quando injetadas por via subcutânea, eram capazes de ativar a resposta imune específica muito mais efetiva que quando eram administradas por via intravenosa, assim como a via subcutânea leva a rápida acumulação de células dendríticas nos linfonodos, a magnitude da resposta imune induzida por essas células carregando peptídeos de baixa afinidade é maior após a vacinação subcutânea quando comparada com a intravenosa (EGGERT et al., 1999; LAPPIN et al., 1999; OKADA et al., 2001; HUCK et al., 2008).

As citocinas dosadas nesse estudo foram aquelas que são relacionadas com dois tipos de resposta imunológica importantes na paracoccidiodomicose, IFN- γ e IL-12, como as representativas de resposta padrão Th1, cuja resposta é considerada protetora e as citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10, exemplo de resposta padrão Th2, que agravam o quadro da doença. Apesar de que dependendo do grau da inflamação gerado pela resposta Th1, as citocinas do padrão Th2 são essenciais para o balanço da resposta imune protetora (TRAVASSOS et al., 2008).

As células dendríticas influenciam no padrão de citocinas secretadas por células T, pois tem importante contribuição no tipo de resposta imune final. Embora é difícil correlacionar certos padrões de citocinas com a utilização de células dendríticas como vacina, devido a diferentes fatores influenciarem na secreção dessas moléculas pelas células T, como o subtipo da célula dendrítica, a natureza do estímulo de maturação, o tipo de antígeno utilizado, o microambiente e a frequência de linfócitos T antígeno-específicos no hospedeiro. Estudos mostram que subtipos de células dendríticas como CD11c⁺ CD11b^{dull/-}, que em sua grande maioria são CD8 α ⁺ induzem altas concentrações de IFN- γ e pouca ou nenhuma citocina padrão Th2. As CD11c⁺ CD11b^{bright}, CD8 α ⁻, induzem grandes quantidades de citocinas Th2 como IL-4 e IL-10 além de IFN- γ (MOSER e MURPHY, 2000; SHORTMAN e LIU, 2002; PERRUCCIO et al., 2004).

Resultados de, Almeida e Lopes (2001), utilizando células dendríticas de duas linhagens de camundongos, resistente (A/Sn) e susceptível (B10.A) à infecção por *P. brasiliensis*, indicaram que apesar do número de APCs necessário para atingir proliferação ótima de células T ser muito semelhante para as duas linhagens, as células dendríticas dos animais A/Sn mostraram ser mais eficientes que as células dendríticas de B10.A. Nesse mesmo trabalho avaliaram a secreção de citocinas e observaram que os níveis tanto de IL-2 quanto IFN- γ eram mais baixos no sobrenadante de culturas de células T de camundongos susceptíveis. Os autores sugerem que diferentes subtipos de células dendríticas poderiam controlar esse padrão observado tanto na proliferação celular quanto na secreção de citocinas.

Como não foi realizada caracterização mais detalhada das células dendríticas utilizadas, torna-se difícil especular sobre seu subtipo e seu grau de maturação, mas os resultados mostraram claro padrão Th1, com presença maior de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante do macerado de pulmão dos animais tratados nos dois protocolos terapêuticos (15 e 30 dias). No protocolo terapêutico 30 dias não encontramos níveis detectáveis de IL-4, correlacionando a forte resposta Th1 pois essa citocina é produzida por células Th2 colaborando com aumento, diferenciação e ativação de células B (MOSMANN e COFFMAN, 1989). Estudos em camundongos mostraram que células T CD4⁺, de resposta Th1, que produzem IL-2 e IFN- γ , mas pouca ou nenhuma IL-4, induzem a ativação de macrófagos para destruição de parasitas intracelulares, reações de HTT, e produção de anticorpos IgG2a, mas não IgG1 e IgE (MANETTI et al., 1993).

No protocolo terapêutico 15 dias, apesar dos padrões encontrados nos níveis de citocinas nos grupos controles e tratados seguirem a mesma variação observada nos grupos do protocolo 30 dias, os níveis encontrados de IFN- γ foram muito inferiores quando comparados com os encontrados no protocolo 30 dias, o que pode ser resultado do curto período de infecção. Calich e Kashino (1998), mostraram que em animais susceptíveis, B10.A, nas primeiras semanas da infecção apresentam baixos níveis de IFN- γ e IL-2 acompanhadas de uma presença consistente de altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10.

Em estudo realizado pelo nosso grupo, Buissa-Filho et al. (2008), obtiveram esse mesmo padrão nos níveis de citocinas utilizando 15 dias como período de infecção. Observaram níveis mais baixos de IL-4 e IFN- γ e níveis mais elevados de IL-10 e IL-12.

No protocolo profilático esse padrão foi observado apenas no grupo que recebeu as células dendríticas pela via subcutânea, que foi o único nessa abordagem a apresentar diminuição da carga fúngica em relação ao controle apenas infectado. O grupo que recebeu as

células pela via intravenosa, que não apresentaram melhoria no quadro da infecção também não apresentaram aumento significativo na quantidade de citocinas pró-inflamatórias. O que corrobora com o fato de uma resposta preferencialmente Th1 ser o padrão protetor na PCM, enquanto uma resposta Th2 não é a ideal para o tratamento dessa micose sistêmica.

Nas análises histológicas ficou evidente a melhoria do tecido dos animais dos grupos dos protocolos terapêuticos os quais receberam a vacina de células dendríticas pulsadas com o peptídeo, com diminuição considerável da inflamação no tecido, assim como o número de células fúngicas viáveis. E, apesar de encontrarmos algumas leveduras nos pulmões desses grupos essas se localizavam interiorizadas em granulomas bem definidos, mostrando que a resposta imune conseguiu conter as células fúngicas em único local evitando a disseminação para outros órgãos.

O tratamento vacinal com o P10 utilizando as células dendríticas como adjuvante resultou em melhora significativa na inflamação nos pulmões dos animais. Não obtivemos esterilidade do fungo no hospedeiro, todavia abre-se margem para uma série de novos testes que colaborem para alcançar esse objetivo. Poderiam ser utilizadas mais doses da vacina, pois duas doses foram o máximo utilizado nesse trabalho. Talvez com o aumento das doses a cura estéril poderia ser atingida.

Uma alternativa seria a co-administração da vacina com métodos quimioterápicos usuais, como itraconazol ou a combinação sulfametoxazol/trimetoprim, o que poderia levar a esterilidade fúngica no hospedeiro ou mesmo a diminuição no tempo de tratamento.

Em síntese, os resultados obtidos nesse trabalho são muito promissores e indicam como as células dendríticas podem ser utilizadas no tratamento ou cura da paracoccidiodomicose experimental, apresentando a grande vantagem de não ser necessário a adição de nenhum outro adjuvante. De maneira que deve ser considerada uma terapia utilizando células dendríticas em infecções como a PCM, seja apenas as células dendríticas pulsadas ou essa mesma vacina em combinação com tratamentos usuais.

6 CONCLUSÕES

- A utilização de células dendríticas como adjuvante permite diminuição na concentração de peptídeo utilizada em comparação com outras metodologias utilizadas;
- As células dendríticas pulsadas com o P10 foram capazes de, *in vitro*, ativar e induzir a proliferação de células de baço primadas com o peptídeo *in vivo*;
- No protocolo profilático somente a via subcutânea mostrou efeito positivo, enquanto nos protocolos terapêuticos, ambas as vias (intravenosa e subcutânea) foram efetivas;
- A vacina contendo células dendríticas pulsadas com o P10 foi capaz de induzir uma diminuição significativa na carga fúngica nos pulmões de animais tratados, assim como diminuição da inflamação nesses tecidos;
- As citocinas do macerado de pulmão mostram uma polarização da resposta imune para o padrão Th1, com maiores níveis de IL-12 e IFN- γ , em todos os protocolos aplicados.

REFERÊNCIAS*

- ADAMS, S.; O'NEILL, D. W.; BHARDWAJ, N. Recent advances in dendritic cell Biology. **J. Clin. Immunol.**, v. 25, n. 2, p. 87-98, 2005.
- ALBORNOZ, M. C. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, n. 3, p. 248-252, 1971.
- ALMEIDA, F. P. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **An. Fac. Med. São Paulo**, v. 5, p. 125-141, 1930.
- ALMEIDA, S. R.; LOPES, J. D. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 4, p. 529-537, 2001.
- AMARAL, A. C.; MARQUES, A. F.; MUNOZ, J. E.; BOCCA, A. L.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; MORAIS, P. C.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P.; FELIPE, M. S. Poly(lactic acid-glycolic acid) nanoparticles markedly improve immunological protection provided by peptide P10 against murine paracoccidioidomycosis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 159, n. 5, p. 1126-1132, 2010.
- ARANGO, M.; YARZABAL, L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 79, p. 115-119, 1982.
- ARDAVIN, C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 582-590, 2003.
- AUDRAN, R., LURATI-RUIZ, F.; GENTON, B.; BLYTHMAN, H. E.; OFORI-ANYINAM, O.; REYMOND, C.; CORRADIN, G.; SPERTINI, F. The Synthetic *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Peptide PfCS102 as a Malaria Vaccine Candidate: A Randomized Controlled Phase I Trial. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7304, 2009.
- AUSTYN, J. M. Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies of dendritic cells. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 162, p. S146-S150, 2000.
- BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; CAMARGO, Z. P.; GOMES, G. M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 505-512, 1998.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245-252, 1998.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 767-811, 2000.
- BANCHEREAU, J.; SCHULER-THURNER, B.; PALUCKA, A. K.; SCHULER, G. Dendritic cells as vectors for therapy. **Cell**, v. 106, p. 271-274, 2001.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, p. 209-221, 2008.
- BENARD, G.; DUARTE, A. J. S. Paracoccidioidomycosis: A Model for Evaluation of the Effects of Human Immunodeficiency Virus Infection on the Natural History of Endemic Tropical Diseases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 31, p. 1032-1039, 2000.
- BRAGA, C. J. M.; RITTNER, G. M. G.; 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, n. 4, p. 1700-1707, 2009.
- BOZZA, S.; MONTAGNOLI, C.; GAZIANO, R.; ROSSI, G.; NKWANYUO, G.; BELLOCCHIO, S.; ROMANI, L. Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. **Vaccine**, v. 22, p. 857-864, 2004.
- BRYANT, P.; PLOEGH, H. Class II MHC peptide loading by the professionals. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 16, p. 96-102, 2004.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: An update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 89-117, 1993.
- BUA, J.; BONTEMPI, E.; LEVIN, M.; ORN, A.; VELASCO, D.; MORENO, M.; LEVI-YEYATI, P.; ENGSTROM, A.; SEGURA, E.; RUIZ, A. *Trypanosoma cruzi*: cellular and antibody response against the parasite in mice immunized with a 19-amino acid synthetic peptide. **Exp. Parasitol.**, v. 72, p. 54-62, 1991.
- 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. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 7, p. 3321-3328, 2008.
- CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Path.**, v. 66, p. 585-594, 1985.
- CALICH, V. L. G.; 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. G.; VAZ, C.A.C; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **73 rd Forum in Immunology**, p. 407-417, 1998.

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

CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S. P.; TRAVASSOS, L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion test. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, p. 2147-2151, 1988.

CAMARGO, Z. P.; GESZTESI, J. L.; SARAIVA, E. C.; TABORDA, C. P.; VICENTIN, A. P.; LOPES, J. D. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 2377-2381, 1994.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. 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.

CARVEN, G. J.; CHITTA, S.; HILGERT, I.; RUSHE, M. M.; BAGGIO, R. F.; PALMER, M.; ARENAS, J. E.; STROMINGER, J. L.; HOREJSI, V.; SANTAMBROGIO, L.; STERN, L. J. Monoclonal antibodies specific for the empty conformation of HLA-DR1 reveal aspects of the conformational change associated with peptide binding. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 16, p. 16561-16570, 2004.

CASADEVALL, A. Antibody immunity and invasive fungal infections. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 11, p. 4211-4218, 1995.

CASSONE, A. Fungal vaccines: Real progress from real challenges. **Lancet Infect Dis.**, v. 8, n. 2, p. 114-124, 2008.

CASSONE, A. Fungal vaccines and vaccination: problems and perspectives. In: BROWN, G. D., NETEA, M. G. (Eds.). **Immunology of fungal infections**. Dordrecht: Springer-Verlag, 2007. p. 465-485.

CASTANEDA, E.; BRUMMER, E.; PAPPAGIANIS, D.; STEVENS, D. A. Impairment of cellular but not humoral immune response in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. **Infect. Immun.**, v. 56, n. 7, p. 1771-1777, 1988.

CASTANEDA, E.; BRUMMER, E.; PERLMAN, A. M.; McEWEN, J. G.; STEVENS, D. A. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 26, p. 351-358, 1988.

CAUX, C.; VANBERVLIET, B.; MASSACRIER, C.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; DE SAINT-VIS, B.; JACQUET, C.; YONEDA, K.; IMAMURA, S.; SCHMITT, D.; BANCHEREAU, J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate

along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF alpha. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 695-706, 1996.

CELLUZZI, C. M.; MAYORDOMO, J. I.; STORKUS, W. J.; LOTZE, M. T.; FALO, L. D. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific, CLT-mediated protected tumor immunity. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 283-287, 1996.

CONNOLLY, N. C.; WHITESIDE, T. L.; WILSON, C.; KONDRAGUNTA, V.; RINALDO, C.R.; RIDDLER, S. A. Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, p. 284-292, 2008.

CUTLER, J. E.; DEEPE, G. S., Jr.; KLEIN, B. S. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 13-28, 2007.

DATTA, K.; LEES, A.; PIROFSKI, L. A. Therapeutic efficacy of a conjugate vaccine containing a peptide mimotope of cryptococcal capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, n. 8, p. 1176-1187, 2008.

DECKER, W. K.; XING, D.; LI, S.; ROBINSON, S. N.; YANG, H.; STEINER, D.; KOMANDURI, K. V.; SHPALL, E. J. Th-1 polarization is regulated by dendritic-cell comparison of MHC class I and class II antigens. **Blood**, v. 113, p. 4213-4223, 2009.

DEEPE, G. S., Jr. Prospects for the development of fungal vaccines. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 585-596, 1997.

DEL-NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; ZAMITH, V. A.; SIQUEIRA, A. M. General clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in Childhood. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL-NEGRO, G. (Eds.) **Paracoccidioidomycosis**. Flórida: CRC Press, 1994. p. 225-232.

DONG, C.; FLAVELL, R. A. Th1 and Th2 cells. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 8, p. 47-51, 2001.

EGGERT, A. A.; SCHREURS, M. W.; BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J.; DE BOER, A. J.; PUNT, C. J.; FIGDOR, C. G.; ADEMA, G. J. Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. **Cancer Res.**, v. 59, p. 3340-3345, 1999.

FARKAS, A.; CONRAD, C.; TONEL, G.; BORBENYI, Z.; KEMENY L.; DOBOZY, A.; NESTLE, F. O. Current state and perspectives of dendritic cell vaccination in cancer immunotherapy. **Skin Pharmacol. Physiol.**, v. 19, p. 124-131, 2006.

FERREIRA, K. S.; ALMEIDA S. R. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary paracoccidioidomycosis. **Immunol. Lett.**, v. 103, p. 121-126. 2006.

FERREIRA, K. S.; LOPES, J. D.; ALMEIDA S. R. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunol. Lett.**, v. 94, p. 107-114, 2004.

- FERREIRA, M. S.; FREITAS, L. H.; LACAZ, C. S.; DEL NEGRO, G. M.; DE MELO, N. T.; GARCIA, N. M.; DE ASSIS, C. M.; SALEBIAN, A.; HEINS-VACCARI, E. M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 28, n. 3, p. 253-256, 1990.
- FRANCO, M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 5-18, 1987.
- FRANCO, M.; MENDES, R. P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; MONTENEGRO, M. R. Paracoccidioidomycosis. **Bailliere's Clin. Trop. Med. Commun. Dis.**, v. 4, p. 185-220, 1989.
- GALGIANI, J. N. Vaccines to prevent systemic mycosis: holy grails meet translational realities. **J. Infect. Dis.**, v. 197, n. 7, p. 938-940, 2008.
- GARCÍA, F., LEJEUNE, M.; CLIMENT, N., GIL, C.; ALCAMÍ, J.; MORENTE, V.; ALÓS, L.; RUIZ, A.; SETOAIN, J.; FUMERO, E.; CASTRO, P.; LÓPEZ, A.; CRUCETA, A.; PIERA, C.; FLORENCE, E.; PEREIRA, A.; LIBOIS, A.; GONZÁLEZ, N.; GUILÁ, M.; CABALLERO, M.; LOMENÁ, F.; JOSEPH, J.; MIRÓ, J. M.; PUMAROLA, T.; PLANA, M.; GATELL, J. M.; GALLART, T. Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection. **J. Infect. Dis.**, v. 191, p. 1680-1685, 2005.
- GATTI, E.; PIERRE, P. Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 15, p. 468-473, 2003.
- GEZUELE, E. Aislamiento de Paracoccidioides sp. de heces de pinguino de la Antártida. In: PROCEEDINGS IV INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PARACOCIDIOIDOMYCOSIS, 4, 1989, Caracas, Venezuela. **Resumos...** Caracas, Venezuela: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), 1989. p. B-2.
- GOLDANI, L. Z.; SUGAR, A. M. Paracoccidioidomycosis and AIDS: An overview. **Clin. Infect. Dis.**, v. 21, p. 1275-1281, 1995.
- GROSE, E.; TAMSITT, J. R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Med. Mycol.**, v. 4, n. 2, p. 124-125, 1965.
- GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THERY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 621-667, 2002.
- GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Adjuvants for human vaccines current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v.13, p. 1263-1276, 1995.
- HOLT, P. G; MCMENAMIN, C. Defence against allergic sensitization in the healthy lung: the role of inhalation tolerance. **Clin. Exp. Allergy**, v. 19, n. 3, p. 255- 262.

- HUCK, S. P.; TANG, S. C.; ANDREW, K. A.; YANG, J.; HARPER, J. L.; RONCHESE, F. Activation and route of administration both determine the ability of bone marrow-derived dendritic cells to accumulate in secondary lymphoid organs and prime CD8⁺ T cells against tumors. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 57, p. 63-71, 2008.
- INABA, K., INABA, M.; ROMANI, N.; AYA, H.; DEGUCHI, M.; IKEHARA, S.; MURAMATSU, S.; STEINMAN, R. M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 1693-1702, 1992.
- ITANO, A. A.; JENKINS, M. K. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 8, p. 733-739, 2003.
- IWAI, L. K.; YOSHIDA, M.; SYDNEY, J.; SHIKANAI-YATSUDA, M. A.; GOLDBERG, A. C.; JULIANO, M. A.; HAMMER, J.; JULIANO, L.; SETTE, A.; KALIL, J.; TRAVASSOS, L. R.; NETO, E. C. In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 *Paracoccidioides brasiliensis* frequently recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized individuals. **Mol. Med.**, v. 9, p. 209-219, 2003.
- JAKOB, T.; UDEY, M. C. Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cell by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo. **J. Immunol.**, v.160, p. 4067-4073, 1998.
- KRONIN, V.; HOCHREIN, H.; SHORTMAN, K.; KELSO, A. The regulation of T cell cytokine production by dendritic cells. **Immunol. Cell Biol.**, v. 78, p. 214-223, 2000.
- KUPIEC-WEGLINSKI, J. W.; AUSTYN, J. M.; MORRIS, P. J. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and -independent entry to lymphoid tissues. **J. Exp. Med.**, v. 167, p. 632-645, 1988.
- LACAZ, C. S. Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidioidomicose. Um pouco da história. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; FIORILLO, A. M. (Eds.). **Paracoccidioidomicose Blastomicose Sul-Americana**. São Paulo: Sarvier, 1982. p. 1-9.
- 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. (Eds.). **Paracoccidioidomycosis**. Flórida: CRC Press, 1994. p.13-25.
- LAPPIN, M. B.; WEISS, J. M.; DELATTRE, V.; MAI, B.; DITTMAR, H.; MAIER, C.; MANKE, K.; GRABBE, S.; MARTIN, S.; SIMON, J. C. Analysis of mouse dendritic cell migration in vivo upon subcutaneous and intravenous injection. **Immunology**, v. 98, p. 181-188, 1999.
- LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. **Science**, v. 290, n. 5489, p. 92-97, 2000.
- LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. **Cell**, v. 106, p. 263-266, 2001.

- LIPSCOMB, M. F.; WILDER, J. A.; MASTEN, B. J. Dendritic cells and their role in linking innate and adaptive immune response. In: GESSANI, S.; BELARDELLI, F. (Eds.). **The biology of dendritic cells and HIV infection**. New York: Springer, 2007. p. 44-84.
- LIN, J. S.; YANG, C. W.; WANG, D. W.; WU-HSIEH, B. A. Dendritic cells cross-present exogenous fungal antigens to stimulate a protective CD8 T cell response in infection by *Histoplasma capsulatum*. **J. Immunol.**, v. 174, p. 6282-6291, 2005.
- LIN, C. L.; SURI, R. M.; RAHDON, R. A.; AUSTYN, J. M.; ROAKE, J. A. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 4114-4122, 1998.
- LIU, K.; NUSSENZWEIG, M. C. Origin and development of dendritic cells. **Immunol. Rev.**, v. 234, p. 45-54, 2010.
- LU, W.; ARRAES, L. C.; FERREIRA E SILVA, W. T.; ANDRIEU, J. M. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. **Nat. Med.**, v. 10, p. 1359-1365, 2004.
- LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localisada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hypoblastomycoses americanas. **Braz. Med.**, v. 22, n. 15, p.141-144, 1908.
- LUTZ, M. B.; KUKUTCH, N.; OGILVIE, A. L. J.; RÖBNER, S.; KOCH, F.; ROMANI, N.; SCHULER, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **J. Immunol. Methods**, v. 223, p. 77-92, 1999.
- MACDONALD, K. P.; MUNSTER, D. J.; CLARK, G. J.; DZIOONEK, A.; SCHMITZ, J.; HART, D. N. Characterization of human blood dendritic cell subsets. **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4512-4520, 2002.
- MANETTI, R.; PARRONCHI, P.; GIUDIZI, M. G.; PICCINNI, M.; MAGGI, E.; TRINCHIERI, G.; ROMAGNANI, S. Natural killer cell stimulatory factor (Interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 1199-1204, 1993.
- MANZ, M. G.; TRAVER, D.; MIYAMOTO, T.; WEISSMAN, I. L.; AKASHI, K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. **Blood**, v. 97, n. 11, p. 3333-3341, 2001.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: Atualização Epidemiológica, Clínica e Terapêutica. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 2, p.135-150, 2003.
- MARQUES, A. F.; SILVA, M. B.; JULIANO, M. A. P.; MUNHÖZ, J. E.; 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 Infect.**, v. 10, p. 1251-1258, 2008.

- MARTINEZ, R. Paracoccidioidomicose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 204-221.
- MATTOS GROSSO, D.; ALMEIDA, S. R.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6534-6542, 2003.
- MCEWEN, J. G.; GARCIA, A. M.; ORTIZ, B. L.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.**, v. 26, p. 305-306, 1995.
- MENEZES, V. M.; SOARES, B. G.; FONTES, C. J. F. Drugs for treating paracoccidioidomycosis. **Cochrane Database Syst. Rev.**, n. 2, p.1-16, 2009.
- MONTENEGRO, M. R.; MIYAJI, M.; FRANCO, M.; NISHIMURA, K.; COELHO, K. I.; HORIE, Y.; MENDES, R. P.; SANO, A.; FUKUSHIMA, K.; FECCHIO, D. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, state of Sao Paulo, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 665-670, 1996.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.
- MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, v. 17, n. 3, p. 138-146, 1996.
- MOSER, M.; MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. **Nature Immunol.**, v. 1, p. 199-205, 2000.
- NAVA-PARADA, P.; FORNI, G.; KNUTSON, K. L.; PEASE, L. R.; CELIS, E. Peptide vaccine given with a Toll-like receptor agonist is effective for the treatment and prevention of spontaneous breast tumors. **Cancer Res.**, v. 67, p. 1326-1334, 2007.
- NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. **Prensa Med. Argent.**, v. 53, n. 39, p. 2381-2382, 1966.
- NI, K.; O'NEILL, H. C. The role of dendritic cells in T cell activation. **Immunol. Cell Biol.**, v. 75, p. 223-230, 1997.
- 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.

- OUAISSI, A.; GUILVARD, E.; DELNESTE, Y.; CARON, G.; MAGISTRELLI, G.; HERBAULT, N.; THIEBLEMONT, N.; JEANNIN, P. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-Like receptor 2, and confers protection against lethal infection. **J. Immunol.**, v. 168, p. 6366-6374, 2002.
- PANDEY, M.; BATZLOFF, M. R.; GOOD, M. F. Mechanism of protection induced by group A *Streptococcus* vaccine candidate J8-DT: contribution of B and T-cells towards protection. **PLoS One**, v. 4, p. e5147, 2009.
- PERRY, J. A.; RUSH, A.; WILSON, R. J.; OLVER, C. S.; AVERY, C. Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC. **J. Immunol.**, v. 172, p. 475-482, 2004.
- PERRUCCIO, K.; BOZZA, S.; MONTAGNOLI, C.; BELLOCCHIO, S.; AVERSA, F.; MARTELLI, M.; BISTONI, F.; VELARDI, A.; ROMANI, L. Prospects for dendritic cell vaccination against fungal infections in hematopoietic transplantation. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 33, p. 248-255, 2004.
- PIERRE, P.; TURLEY, S. J.; GATTI, E.; HULL, M.; MELTZER, J.; MIRZA, A.; INABA, K.; STEINMAN, R. M.; MELLMAN, I. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. **Nature**, v. 388, p. 787-792, 1997.
- PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009.
- PLOTKIN, S. A. Vaccines, vaccination and vaccinology. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 1349-1359, 2003.
- PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. A. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*. Identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, v. 53, 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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 1610-1615, 1991.
- PULENDRAN, B.; SMITH, J. L.; CASPARY, G.; BRASEL, K.; PETTIT, D.; MARASKOVSKY, E.; MALISZEWSKI, C. R. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 1036-1041, 1999.
- RAMOS-E-SILVA, M.; SARAIVA, L. E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol. Clin.**, v. 26, n. 2, p. 257-269, 2008.
- RANDOLPH, G. J.; OCHANDO, J.; PARTIDA-SANCHEZ, S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 293-316, 2008.
- REID, C. D.; STACKPOOLE, A.; MEAGER, A.; TIKERPAE, J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony stimulating factor and other cytokines in

the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. **J. Immunol.**, v. 149, n. 8, p. 2681-2688, 1992.

RESTREPO, A.; McEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v. 39, p. 232-241, 2001.

RESTREPO, A.; BENARD, G.; CASTRO, C. C.; AGUDELO, C. A.; TOBÓN, A. M. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, v. 28, n. 2, p. 182-197, 2008.

RICHARDS, J. O.; AMPEL, N. M.; GALGIANI, J. N.; LAKE, D. F. Dendritic cells pulsed with *Coccidioides immitis* lysate induce antigen-specific naive T cell activation. **J. Infect. Dis.**, v. 184, p. 1220-1224, 2001.

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.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 1-23, 2004.

ROMANI, L. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. **Med. Mycol.**, v. 46, n. 6, p. 515-529, 2008.

SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v. 56, n. 3, p. 711-713, 1988.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1109-1118, 1994.

SALLUSTO, F.; CELLA, R. M.; DANIELI, C.; LANZAVECCHIA, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 389-400, 1995.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 31, n. 2, p. 99-113, 1993.

SANTAMBROGIO, L.; SATO, A. K.; FISCHER, F. R.; DORF, M. E.; STERN, L. J. Abundant empty class II molecules on the surface of immature dendritic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, p. 15050-15055, 1999.

SANTIN A. D.; HERMONAT, P. L.; RAVAGGI, A.; CHIRIVA-INTERNATI, M.; ZHAN, D.; PECORELLI, S.; PARHAM, G. P.; CANNON, M. J. Induction of human papillomavirus-specific CD4+ and CD8+ lymphocytes by E7 pulsed autologous dendritic cells in patients with HPV16 and 18 positive cervical cancer. **J. Virol.**, v. 73, p. 5402-5410, 1999.

- SANTOS, W. A.; SILVA, B. M.; PASSOS, E. D.; ZANDONADE, E.; FALQUETO, A. Associação entre tabagismo e paracoccidiodomicose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.19, n.1, p. 245-253, 2003.
- SAUNDERS, D.; K. ISMAILI, L. J.; WU, L.; MARASKOVSKY, E.; DUNN, A.; SHORTMAN, K. Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 2185-2196, 1996.
- SCHULER, G.; STEINMAN, R. M. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. **J. Exp. Med.**, v. 161, p. 526-546, 1985.
- SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". **Manual de vigilância e controle da paracoccidiodomicose**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2008.
- SEGAL, B. H.; KWON-CHUNG, J.; WALSH, T. J.; KLEIN, B. S.; BATTIWALLA, M.; ALMYROUDIS, N. G.; HOLLAND, S. M.; ROMANI, L. Immunotherapy for fungal infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, p. 507-515, 2006.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. e grupo de consultores em paracoccidiodomicose. Consenso em paracoccidiodomicose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.
- SHOME, S. K.; BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil in Recife, Brazil. **Rev. Fac. Med. Univ. Federal Ceará**, v. 3, p. 90-94, 1963.
- SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cells subtypes. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 151-161, 2002.
- SILLE, F. C. M.; VISSER, A.; BOES, M. T cell priming by tissue-derived dendritic cells: new insights from recent murine studies. **Cell. Immunol.**, v. 237, p. 77-85, 2005.
- SINGER-VERMES, L. M.; CALDEIRA, C. B.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Experimental murine paracoccidiodomycosis: relationship among dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 94, p. 75-79, 1993.
- SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, A. L.; FREITAS-SILVA, G.; LEITE-MAFFEI, C. M. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol.**, v. 36, n. 1, p. 37-42, 1998.
- SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z. P.; MALTA, M. H. B.; MAFFEI, C. M. L.; CHADY, J. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, n. 3, p. 193-199, 2000.

- SOONG, L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. **J. Immunol.**, v. 180, p. 4355-4360, 2008.
- SPLENDORE, A. Zymonematosi con localizzazione nella cavità della boca, osservata in Brasile. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 5, p. 313-319, 1912.
- STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs in mice. I. Morphology, quantification, tissue distribution. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 1142-1162, 1973.
- STEINMAN, R. M.; WITMER, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, n. 10, p. 5132-5136, 1978.
- STEINMAN, R. M.; POPE, M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. **J. Clin. Investig.**, v. 109, p. 1519-1526, 2002
- STEVENS, D. A. Vaccinate against aspergillosis! A call to arms of the immune system. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, p. 1131-1136, 2004.
- TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 554-556, 1994.
- TABORDA, C. P.; JULIANO, M. A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L. R. Mapping of the T-cell epitope in the major 43 kDa 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.
- THURNER, B.; HAENDLE, I.; RÖDER, C.; DIECKMANN, D.; KEIKAVOUSSI, P.; JONULEIT, H.; BENDER, A.; MACZEK, C.; SCHREINER, D.; VON DEN DRIESCH, P.; BRÖCKER, E. B.; STEINMAN, R. M.; ENK, A.; KÄMPGEN, E.; SCHULER, G. Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. **J. Exp. Med.**, v. 190, p. 1669-1678, 1999.
- TRAVASSOS, L. R.; RODRIGUES, E. G.; IWAI, L. K.; TABORDA, C. P. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. **Mycopathologia**, v. 165, p. 341-352, 2008.
- TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P.; COLOMBO, A. L. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 6, n. 2, p. 251-262, 2008
- TROMBETTA, E. S.; MELLMAN, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 975-1028, 2005.
- TURLEY, S J.; INABA, K.; GARRETT, W. S.; EBERSOLD, M.; UNTERNAEHRER, J.; STEINMAN, R. M.; MELLMAN, I. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. **Science**, v. 288, p. 522-527, 2000.

VICENTINI, A. P.; GESZTESI, J. L.; FRANCO, M. F.; DE SOUZA, W.; DE MORAES, J. Z.; TRAVASSOS, L. R.; LOPES, J. D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1465-1469, 1994.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. How diverse – CD4 effector T cells and their functions. **J. Mol. Cell Biol.**, v. 1, n. 1, p. 20-36, 2009.

WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL-NEGRO, G., eds. **Paracoccidioidomycosis**. Flórida: CRC Press, 1994. p. 109-120.

WANKE, B.; AIDE, M. A. Capítulo 6 - Paracoccidioidomicose. **J. Bras. Pneumol.**, v. 35, n. 12, p. 1245-1249, 2009.