

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

TAISE NATALI LANDGRAF

Monofosforil lipídeo A e diidrolipoil desidrogenase de
Paracoccidioides brasiliensis têm efeito terapêutico na
paracoccidiodomicose experimental

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Monofosforil lipídeo A e diidrolipoil desidrogenase de
Paracoccidioides brasiliensis têm efeito terapêutico na
paracoccidiodomicose experimental

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Panunto-Castelo

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Landgraf, Taise Natali
Monofosforil lipídeo A e diidrolipoil desidrogenase de *Paracoccidioides brasiliensis* têm efeito terapêutico na paracoccidioidomicose experimental, 2016. 129 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Panunto-Castelo, Ademilson.

1. Paracoccidioidomicose. 2. *Paracoccidioides brasiliensis*. 3. Imunoterapia. 4. Adjuvantes. 5. Monofosforil lipídeo A. 6. Antígenos. 7. Diidrolipoil desidrogenase.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: LANDGRAF, Taise Natali

Título: Monofosforil lipídeo A e diidrolipoil desidrogenase de *Paracoccidioides brasiliensis* têm efeito terapêutico na paracoccidioidomicose experimental

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências – Área de Concentração: Imunologia
Básica e Aplicada.

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia, Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da FAPESP (2012/08552-0).

"Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu."

(Érico Veríssimo)

“Você se fez presente em todos os momentos firmes e trêmulos. E, passo a passo, pude sentir a sua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir... A tua presença é qualquer coisa como a luz e a vida, e sinto que, em meu gesto, existe o teu gesto e em minha voz, a tua voz.”
(Vinicius de Moraes)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sidnei e Sonia, que sempre me ensinaram a agir com respeito, simplicidade, dignidade e amor ao próximo.

Ao meu marido Paulo, por sua dedicação, amor e apoio incondicional.

Ao meu irmão Thiago, exemplo de humildade e generosidade.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ademilson Panunto-Castelo, expressei meu profundo agradecimento pela orientação, por confiar em minha capacidade, pelo exemplo de pesquisador e professor e pela cordialidade com que sempre me recebeu durante todos esses anos. Muito obrigada!

“Se és capaz de aceitar teus alunos como são, com suas diferentes realidades sociais, humanas e culturais; se os levas a superar as dificuldades, limitações ou fracassos, sem humilhações, sem inúteis frustrações; se os levas a refletir mais do que decorar; se te emocionas com a visão de tantas criaturas que de ti dependem para desabrochar em consciência, criatividade, liberdade e responsabilidade, então podes dizer: sou mestre!”
(Rui Barbosa)

À Profa. Dra. Arlete Ap. Martins Coelho-Castelo, Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira da FMRP/USP e Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman da FFCLRP/USP por disponibilizarem prontamente os laboratórios.

Ao meu amigo Fabrício Freitas Fernandes, por todo apoio, amizade, conselhos, pelas valiosas dicas na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório que me acompanharam nestes anos, Gabriela Peron, Marcelo Vieira Costa, Priscila Cristina Correa, Igor E. Lemos de Souza, pela amizade, risadas, ensinamentos, apoio e compreensão e auxílio prestado neste trabalho.

Aos amigos que conheci nesta caminhada, Amanda Zangirolamo, Anieli Maraschi, Gabriela de Sá Azarias, Micássio Andrade, Andréa Quiapim, pelo apoio, bons momentos de risadas e pela disponibilidade constante.

Aos funcionários Ana Paula Masson, Elaine Medeiros Floriano, Izaíra Tincani Brandão, Renato Meirelles, Vani Maria Alves Correa, Wander Ribeiro da Silva, Wendy Martin Rios, pela valiosa colaboração e disponibilidade constantes.

À Ana Cristine Silva Ferreira, secretária do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP-USP pela competência, disponibilidade e auxílio.

Aos familiares e amigos, aqui não citados, mas que de diferentes formas se fizeram presentes e me apoiaram.

A todos os professores, funcionários e colegas que de forma indireta ou direta, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

RESUMO

LANDGRAF, T. N. Monofosforil lipídeo A e diidrolipoil desidrogenase de *Paracoccidioides brasiliensis* têm efeito terapêutico na paracoccidioidomicose experimental. 129f. 2016. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos dimórficos do gênero *Paracoccidioides* – *P. brasiliensis* ou *P. lutzii*. A alta incidência da PCM no Brasil, somada à gravidade que o quadro clínico pode assumir e ainda à ausência de um antifúngico de baixa toxicidade para tratamento de curta duração, motivaram a avaliação de adjuvantes e caracterização dos componentes antigênicos de *P. brasiliensis* em um modelo imunoterapêutico de PCM. Assim, inicialmente, avaliou-se o efeito de monofosforil lipídeo A (MPLA) de *Salmonella minnesota*, PAM₃CSK₄, hidróxido de alumínio e AS04 em camundongos cronicamente infectados com *P. brasiliensis*. Quando camundongos da linhagem BALB/c foram infectados pela via intratraqueal com 3×10^5 leveduras de *P. brasiliensis*, tratados no dia 20 após a infecção com um dos adjuvantes e analisados 30 dias após a administração do tratamento, observou-se que MPLA, ao contrário dos outros adjuvantes, induziu (1) uma redução significativa no número de unidades formadoras de colônias (UFC), (2) uma expressiva diminuição no número de granulomas e células fúngicas no tecido pulmonar e (3) uma resposta imunológica protetora (Th1) quando comparado aos animais controle tratados com PBS. Quanto ao rastreamento de antígenos de *P. brasiliensis* candidatos a agentes terapêuticos, evidenciou-se que as frações proteicas da preparação de exoantígenos (ExoAg) eram as mais promissoras. Dentre essas frações, a que continha o ExoAg majoritário diidrolipoil desidrogenase induziu maior porcentagem de proliferação de linfócitos T CD3⁺ esplênicos de camundongos infectados e tratados com MPLA. O gene de diidrolipoil desidrogenase foi clonado em vetor de expressão e a proteína recombinante produzida, purificada e utilizada no protocolo terapêutico da PCM experimental. Surpreendentemente, a administração terapêutica de diidrolipoil desidrogenase recombinante induziu uma redução significativa na contagem de UFC dos animais infectados cronicamente com *P. brasiliensis*, mesmo na ausência de adjuvantes, o que não foi observado quando foi administrada a preparação de ExoAg nos animais. A localização subcelular de diidrolipoil desidrogenase, por microscopia eletrônica de transmissão, utilizando anticorpos policlonais de camundongos contra essa proteína, mostrou que a mesma está localizada na mitocôndria e também no citoplasma. A análise da expressão gênica diferencial de diidrolipoil desidrogenase em *P. brasiliensis* mostrou que essa proteína é significativamente mais expressa em leveduras em comparação a hifas e formas de transição. Em conclusão, nossos resultados mostram os efeitos benéficos de MPLA na PCM experimental e sugerem que diidrolipoil desidrogenase é um alvo terapêutico potencial para o tratamento da PCM.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. *Paracoccidioides brasiliensis*. Imunoterapia. Adjuvantes. Monofosforil lipídeo A. Antígenos. Diidrolipoil desidrogenase.

ABSTRACT

LANDGRAF, T. N. Monophosphoryl lipid A and dihydrolipoyl dehydrogenase from *Paracoccidioides brasiliensis* have therapeutic effect on experimental paracoccidioidomycosis. 129p. 2016. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides* – *P. brasiliensis* and *P. lutzii*. The high incidence of PCM in Brazil, added to the severity of the disease and the absence of an antifungal that brings together low toxicity and short-term treatment, led us to evaluate adjuvants and characterize antigenic components of *P. brasiliensis* that could be used as immunotherapy in an experimental model of PCM. In this work, firstly, we evaluated monophosphoryl lipid A (MPLA) from *Salmonella minnesota*, PAM₃CSK₄, aluminum hydroxide and AS04 in mice chronically infected with *P. brasiliensis*. When mice were infected intratracheally with 3×10^5 *P. brasiliensis* yeasts, treated with one of the adjuvants or vehicle on day 20 postinfection, and analyzed 30 days after the treatment, we observed that MPLA, unlike other adjuvants, induced (1) a significant reduction in the number of colony forming units (CFU) in the lungs of the mice, (2) an expressive decrease of granulomas and yeast cells in lung tissue, and (3) a more protective immune response (Th1) when compared with the control mice. Concerning to detection of antigens for PCM therapy, we noticed that among the fractions of a preparation of exoantigens (ExoAg), the one containing the protein identified as dihydrolipoyl dehydrogenase induced a high percentage of proliferation of splenic CD3⁺ T lymphocytes from mice infected and treated with MPLA. The gene of dihydrolipoyl dehydrogenase was cloned into expression plasmid vector, and the recombinant protein produced, purified and used in the therapeutic protocol of experimental PCM. Surprisingly, the therapeutic administration of recombinant dihydrolipoyl dehydrogenase, but not ExoAg preparation, induced a significant reduction in fungal load in the animals chronically infected with *P. brasiliensis*, even in the absence of adjuvants. Immunogold labeling and transmission electron microscopy revealed that the dihydrolipoyl dehydrogenase is localized in mitochondria and cytoplasm of *P. brasiliensis*. The differential expression of dihydrolipoyl dehydrogenase gene in *P. brasiliensis* showed that yeast had an expression more significant than hyphae, with an intermediate level of gene expression in the transitional forms. In conclusion, our results show that MPLA and dihydrolipoyl dehydrogenase are potential therapeutic targets for the treatment of PCM due to their beneficial effects in a therapy model of PCM.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. *Paracoccidioides brasiliensis*. Immunotherapy. Adjuvants. Monophosphoryl lipid A. Antigens. Dihydrolipoyl dehydrogenase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC – Aloficocianina
- AS04 – do inglês, *Adjuvant system 04*
- BHI – do inglês, *Brain Heart Infusion*
- CBA – do inglês, *Cytometric Bead Array*
- cDNA – DNA complementar
- CFA – do inglês, *Complete Freund Adjuvant*
- CFU – do inglês, *Colony forming units*
- CLR – do inglês, *C-type lectin receptors*
- dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
- DO – Densidade óptica
- DTH – Reação de hipersensibilidade retardada
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína
- FPLC – do inglês, *Fast protein liquid chromatography*
- FSC – do inglês, *Forward Scatter*
- gp43 – Glicoproteína de superfície de 43kDa
- HE – Hematoxilina-eosina
- IFN- γ – Interferon- γ
- Ig - Imunoglobulina
- IL – Interleucina
- iNOS – Oxido nítrico sintase induzível
- IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
- LB – Luria-Bertani
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MM – Massa Molecular
- MPLA – Monofosforil lipídeo A
- MyD88 – Fator 88 de Diferenciação Mielóide
- NO – Óxido nítrico
- NOD – do inglês, *Nod-like receptors*
- PAMP – do inglês, *Pathogen-associated molecular patterns*
- PBS – do inglês, *Phosphate buffered saline*
- PCM – Paracoccidioidomicose
- PCR – do inglês, *Polimerase chain reaction*
- PRR – do inglês, *Pattern recognition receptors*

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

RNA – Ácido Ribonucléico

RT-PCR – do inglês, *Reverse transcriptase chain reaction*

SBF – Soro Bovino Fetal

SDS-PAGE – do inglês, *Sodium Duodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*

SSC – do inglês, *Side Scatter*

Th – do inglês, *T helper*

TLR – do inglês, *Toll-like receptors*

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

Tregs – T reguladoras

TRIF – do inglês, *TIR domain-containing adapter inducing IFN- β*

UFC – Unidades formadoras de colônias

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Paracoccidiodomicose: aspectos gerais	1
1.2. Imunologia da PCM.....	4
1.3. Adjuvantes e imunomoduladores.....	8
1.4. Antígenos e estratégias de tratamento e profilaxia na PCM experimental	10
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Cultivo de <i>P. brasiliensis</i>	15
3.2. Animais.....	15
3.3. Determinação da viabilidade dos fungos	16
3.4. Infecção dos camundongos com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	16
3.5. Protocolo de tratamento experimental	16
3.6. Recuperação das leveduras	18
3.7. Análise histopatológica.....	18
3.8. Análise da produção de citocinas pulmonares	18
3.9. Produção, fracionamento e análise eletroforética de antígenos de <i>P. brasiliensis</i>	19
3.9.1 Preparação de antígenos somáticos (AgSom) e exoantígenos (ExoAg) solúveis de <i>P. brasiliensis</i>	19
3.9.2 Análise eletroforética.....	19
3.9.3 Transferência de proteínas para a membrana de PVDF	19
3.10. Clonagem gênica e expressão da proteína recombinante.....	20
3.10.1 Extração do RNA	20
3.10.2 Confeção do DNA complementar (cDNA)	20
3.10.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	21
3.10.4 Clonagem do gene completo de diidrolipoil desidrogenase.....	21

3.10.5	Transformação bacteriana.....	22
3.10.6	Indução e purificação de proteínas recombinantes – diidrolipoil desidrogenase e Gp43 de <i>P. brasiliensis</i>	22
3.11.	Ensaio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> utilizando frações antigênicas ou diidrolipoil desidrogenase recombinante.....	23
3.11.1	Detecção de mensagens para citocinas por RT-PCR em tempo real.....	23
3.11.2	Reação de hipersensibilidade retardada (DTH).....	25
3.11.3	Ensaio de linfoproliferação de linfócitos isolados de animais tratados com MPLA e estimulados com diferentes frações antigênicas de <i>P. brasiliensis</i>	25
3.11.4	Ensaio de fagocitose/ atividade fungicida	27
3.11.5	Produção de anticorpos policlonais antiidrolipoil desidrogenase	27
3.11.6	Microscopia eletrônica de transmissão para localização subcelular de diidrolipoil desidrogenase.....	28
3.11.7	Análise a expressão diferencial do gene que codifica diidrolipoil desidrogenase por RT-PCR em tempo real	29
3.11.8	<i>Western blotting</i>	29
3.12.	Análise estatística.....	30
4.	RESULTADOS	31
4.1.	Tratamento da PCM experimental.....	31
4.2.	Separação de preparações antigênicas de <i>P. brasiliensis</i> e indução de hipersensibilidade retardada em animais tratados com CFA	32
4.3.	Rastreamento de adjuvantes promissores para o tratamento da PCM experimental .	34
4.4.	Rastreamento de frações antigênicas que induzem ativação <i>in vitro</i> de células esplênicas de animais infectados e tratados com MPLA.....	38
4.5.	Sequenciamento da proteína de aproximadamente 60kDa majoritariamente <i>P. brasiliensis</i> liberada no meio extracelular	42
4.6.	Clonagem e expressão heterológica de diidrolipoil desidrogenase de <i>P. brasiliensis</i> ..	43
4.6.1.	Clonagem do gene de diidrolipoil desidrogenase.....	43
4.6.2.	Indução, expressão e purificação de diidrolipoil desidrogenase recombinante..	46

4.7. Análise do efeito de diidrolipoil desidrogenase na proliferação de linfócitos esplênicos de animais tratados com MPLA, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos isolados da cavidade peritoneal	47
4.8. Camundongos BALB/c infectados cronicamente com <i>P. brasiliensis</i> e tratados com a proteína diidrolipoil desidrogenase tem diminuição na carga fúngica e melhora do quadro inflamatório pulmonar	49
4.9. Sublocalização da proteína diidrolipoil desidrogenase e análise da expressão gênica diferencial em células de <i>P. brasiliensis</i> nas formas de micélio e levedura.....	53
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	67
7. REFERÊNCIAS	68
8. ANEXOS	80
9. APÊNDICES.....	81

1. INTRODUÇÃO

No mundo, estima-se que aproximadamente 1,2 bilhão de pessoas são acometidas por algum tipo de doença fúngica. Uma porcentagem substancial dessas infecções afeta somente pele e mucosas, e apresenta resposta rápida à terapia antifúngica. No entanto, uma minoria crônica ou invasiva é, na maioria das vezes, de difícil diagnóstico e tratamento (Denning e Bromley, 2015).

Na América Latina, os fungos patogênicos responsáveis por micoses endêmicas que tem importante impacto na saúde pública são *Histoplasma*, *Coccidioides* e *Paracoccidioides*, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM) (Colombo *et al.*, 2011).

1.1. Paracoccidioidomicose: aspectos gerais

A PCM é uma micose sistêmica, de evolução crônica e granulomatosa. O primeiro relato da doença humana foi feito em 1908 pelo médico e cientista brasileiro Adolfo Lutz (*apud* Negroni, 1993), que detectou o fungo em lesões da mucosa oral de dois pacientes. Estudos posteriores permitiram a classificação do fungo que foi denominado *Paracoccidioides brasiliensis* (Almeida, 1930). Por um longo tempo, *P. brasiliensis* foi considerado a única espécie que causa PCM. No entanto, recentes análises filogenéticas revelaram que um isolado clínico de *P. brasiliensis*, o Pb01, representa uma espécie separada, agora denominado *P. lutzii*, em homenagem ao médico Adolfo Lutz, e que *P. brasiliensis*, na verdade, contém um complexo de pelo menos quatro espécies crípticas diferentes, S1, PS2, PS3 e PS4 (Matute *et al.*, 2006; Carrero *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009; Theodoro *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2014). A espécie filogenética S1 está amplamente distribuída na América do Sul, com destaque para os países: Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela, e tem sido associada com a maioria dos casos de PCM detectada até ao presente momento (Matute *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2014; Da Silva *et al.*, 2016). Alguns isolados da espécie filogenética PS2 foram encontrados no Brasil, nos estados de São Paulo e Minas Gerais, e também na Venezuela; PS3 é um grupo geograficamente restrito à Colômbia (Matute *et al.*, 2006; Carrero *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2016) e PS4 que foi recentemente descrita em isolados obtidos da Venezuela (Theodoro *et al.*, 2012). *P. lutzii* foi encontrado, até o momento, na região central e noroeste do Brasil, predominantemente em uma faixa que vai dos estados de Goiás a Rondônia, e também no Equador (Teixeira *et al.*, 2014).

A PCM é a micose sistêmica mais importante da América Latina. A epidemiologia da doença é dificultada, entre outras razões, porque a notificação de casos não é obrigatória e há dificuldades no diagnóstico laboratorial em algumas áreas endêmicas. Com base em relatórios de estudos epidemiológicos e séries de casos, no Brasil, a PCM tem uma incidência estimada de um a quatro novos casos/100.000 habitantes/ano (Martinez, 2015). Em áreas com grandes diferenças socioambientais, a incidência da micose pode chegar temporariamente a taxas mais elevadas. O estado de Rondônia, por exemplo, apresenta incidência anual média de 9,4 casos/100.000 habitantes, acima da média brasileira, porém mais impressionante são algumas regiões deste estado (mais especificamente a região sudeste) como a municipalidade de Pimenteiras do Oeste com 39,1 casos/100.000 habitantes e Espigão do Oeste com 37,4/100.000 (cidade de Espigão do Oeste), no período de 1997-2012 (Vieira *et al.*, 2014).

Em áreas com alta prevalência de PCM, a doença afeta predominantemente os trabalhadores rurais do sexo masculino, muitas vezes durante os anos mais produtivos de sua vida, entre 30 e 60 anos de idade, representando um importante impacto social, econômico e médico (Colombo *et al.*, 2011; Bocca *et al.*, 2013). Em uma análise descritiva dos registros de internações devido a PCM, no período de 1998-2006, Coutinho *et al.* (2015) relatou 6.732 hospitalizações (82% do sexo masculino), o que representa 4,3/milhão de habitantes, registradas em 27% dos 5.560 municípios brasileiros. Em relação à mortalidade no Brasil, a taxa média anual é de 1,65 por milhão de habitantes, a mais alta para qualquer micose sistêmica, tornando a PCM a oitava causa de mortalidade mais importante entre as doenças infecciosas e parasitárias crônicas ou recorrentes (Coutinho *et al.*, 2002; Colombo *et al.*, 2011; Bocca *et al.*, 2013).

Fungos do gênero *Paracoccidioides* são assexuados e dimórficos e que crescem na forma filamentosa a 25°C e na forma de levedura a 37°C; são encontrados na natureza em determinados nichos ecológicos (Da Silva *et al.*, 1994; De Almeida, 2005). Nos seres humanos, a infecção natural ocorre após a inalação de fragmentos de hifas ou conídios no ambiente e subsequente deposição nas mucosas da via respiratória, sendo mais comum a ocorrência pulmonar. A introdução pode ocorrer nas mucosas ou na derme (Proença *et al.*, 1981), devido à ocorrência de ferimentos e de outras situações menos comuns (González-Ochoa, 1972). Para o desenvolvimento da doença, dois aspectos são importantes: (1) a transformação do fungo de hifa para levedura, mudança que, como anteriormente referida, é responsável pelo estabelecimento do processo infeccioso (Bagagli *et al.*, 2008) e (2) a interação inicial da levedura com o sistema imunitário do

hospedeiro, relação que determina a destruição ou manutenção das formas iniciais infectantes.

Considera-se que as manifestações clínicas da PCM sejam decorrentes da progressão de lesões primárias, pela reativação de focos quiescentes após um período de latência (reativação endógena), ou pela reinfecção exógena após exposição ao fungo (Montenegro, 1994). Na dependência de fatores relacionados ao hospedeiro, como susceptibilidade genética à infecção e estado imunitário (Robledo *et al.*, 1982), e relacionados ao fungo, como virulência e patogenicidade (San-Blas, 1985), a infecção pode regredir com a destruição ou persistência de fungos viáveis em focos quiescentes ou ainda progredir com o desenvolvimento de lesões ativas, proliferação e disseminação do fungo (Franco, 1987; Montenegro, 1994). Inicialmente, a doença envolve os pulmões, onde são formados os granulomas responsáveis pelo controle da disseminação do fungo para outros órgãos (Franco *et al.*, 1993; De Brito e Franco, 1994).

A PCM possui duas manifestações clínicas principais: a forma crônica (tipo adulto) ou forma aguda/subaguda (tipo juvenil) (Restrepo *et al.*, 2012). A forma aguda/subaguda de PCM afeta principalmente crianças ou jovens adultos é caracterizada pela gravidade, com uma rápida progressão (desenvolve-se em semanas a meses), tendência à disseminação linfática e hematogênica com grande quantidade de fungos originando lesões secundárias e viscerais, principalmente no baço, fígado e medula óssea, e significativa taxa de mortalidade. Essa forma clínica ocorre entre 5 e 11% dos pacientes, sendo raro o acometimento pulmonar (Franco, 1987; Mendes, 1994; Sidrim, 2004). A forma crônica é a mais comum, respondendo por 80% dos casos, caracterizando-se pela infecção dos pulmões e órgãos extrapulmonares (principalmente a pele e mucosas); fibrose pulmonar ocorre na maioria destes pacientes (Bocca *et al.*, 2013; Marques, 2013; Martinez, 2015).

Antes da introdução das sulfonamidas, em 1940, todos os pacientes com PCM morriam devido a complicações. Apesar das drogas antifúngicas serem importantes para tratar pacientes com PCM, alguns estudos mostram que a letalidade ainda é alta, 16,2 a 20,7%, devido às múltiplas lesões e consequente disfunção respiratória (Martinez, 2015). Na clínica, a escolha do tratamento para PCM leva em consideração a gravidade da doença. O tratamento convencional inclui derivados de sulfa (sulfadiazina, sulfadoxina e sulfametazol-trimetropin) e azólicos (cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol e posaconazol), sendo que nas formas graves e disseminadas da doença, a anfotericina B, em ambas as formulações – convencional e lipídica, tem sido utilizada (Bocca *et al.*,

2013). Frequentemente, o tratamento de doenças fúngicas com esses agentes é de longa duração e as principais preocupações associadas com o uso dessas drogas antifúngicas são o abandono do tratamento e efeitos colaterais, tais como toxicidade e resistência em pacientes anérgicos (Del Negro *et al.*, 2000; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Durante a terapia antifúngica das formas graves de PCM, algumas reações teciduais, como dano ao tecido e comprometimento da função do órgão, podem se tornar mais graves (Benard *et al.*, 2012).

1.2. Imunologia da PCM

Embora as infecções por *P. brasiliensis* e *P. lutzii* devam ser muito similares, a imensa maioria dos trabalhos sobre PCM foi feita com *P. brasiliensis*. Como anteriormente citado, existe consenso que a infecção por esses fungos acontece pela inalação de propágulos que alcançam as vias aéreas do hospedeiro, onde ocorre a interação inicial da levedura com o sistema imunológico, relação que determina a destruição ou manutenção das formas iniciais infectantes. Assim, a resposta à infecção é mediada pela secreção de proteínas antimicrobianas pelo epitélio pulmonar e atividade fagocítica de macrófagos alveolares residentes (Calich *et al.*, 2008). A ativação dessas células fagocíticas e modulação das respostas é mediada pela interação dos receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors*, PRR), dentre os quais se destacam os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLR) e receptores com domínio lectínico tipo C (*C-type lectin receptors*, CLR), com estruturas moleculares de patógenos, amplamente conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) (Romani, 2011). Os TLRs, associados às proteínas adaptadoras, após a ligação com PAMP, são capazes de desencadear respostas do tipo T auxiliar do tipo 1 (*T helper 1*, Th1) ou Th2, num mecanismo dependente da estimulação antigênica (Amati *et al.*, 2006). O reconhecimento de *P. brasiliensis* pode ser mediado por TLR, tais como o TLR2 e o TLR4, e o receptor dectina-1 (Loures *et al.*, 2010). Além das respostas de macrófagos ativados, os componentes metabólicos e somáticos do fungo, assim como os constituintes de parede celular são capazes de ativar o sistema complemento e de estimular o *burst* respiratório e a quimiotaxia de neutrófilos, os quais participam da imunidade inata durante a PCM (Crott *et al.*, 1993; Pina *et al.*, 2006).

Embora haja em seres humanos uma complexidade de mecanismos moduladores e de fatores externos que interferem com o estabelecimento e desenvolvimento da PCM,

estudos bem definidos em modelos experimentais têm mostrado uma correlação entre o desenvolvimento de um padrão de resposta imunológica celular com predominância da ativação de linfócitos Th1, que secretam interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e menor gravidade da doença (Robledo *et al.*, 1982; Cano *et al.*, 1998; Kashino *et al.*, 2000; Pina *et al.*, 2004).

De fato, o balanço entre resistência e suscetibilidade do hospedeiro ao fungo depende da imunidade celular desenvolvida em resposta ao patógeno, sendo mediada por células T, no sítio inicial da infecção, e conseqüentemente com a secreção de citocinas de padrão Th1 e Th2 (Calich e Kashino, 1998; Oliveira *et al.*, 2002; Romani, 2004). Modelo experimental de infecção por *P. brasiliensis* em camundongos susceptíveis (B10/A) e resistentes (A/Sn) contribuiu para uma melhor compreensão do papel imunomodulador das citocinas na PCM (Calich e Kashino, 1998). Macrófagos de animais susceptíveis secretam altos níveis de TGF- β e baixos níveis de TNF- α . Em termos de citocinas de linfócitos, verifica-se ainda, que nesses animais existem produções baixas de citocinas Th1, IFN- γ , e altas de citocinas Th2, IL-5 e IL-10. Já nos camundongos resistentes, constatou-se perfil oposto de secreção de citocinas acompanhado das produções precoce de IFN- γ e IL-2, e tardia de IL-4 e IL-5. Assim, reforça-se a ideia de que a resistência à infecção por *P. brasiliensis* esteja associada à secreção de altos níveis de TNF- α e IFN- γ , seguida de produção contínua de IL-2 e IFN- γ . Por outro lado, a liberação pequena e efêmera de TNF- α e IFN- γ , associada à produção de IL-5, IL-10 e TGF- β , corre em formas progressivas da PCM, como a que acomete os animais susceptíveis. Vários estudos têm demonstrado a participação de TNF- α e IFN- γ no desenvolvimento de uma resposta imunitária protetora à infecção experimental por *P. brasiliensis* (Cano *et al.*, 1998; Souto *et al.*, 2000; Calvi *et al.*, 2003).

A atividade fungicida de macrófagos, otimizada pela ativação com IFN- γ , tem sido atribuída à produção de óxido nítrico (NO) pela enzima NO sintase induzível (iNOS). A indução dessa enzima parece ser decorrente não somente da ação sinérgica de citocinas Th1, como IFN- γ e TNF- α , mas também de produtos liberados pelo próprio agente patogênico. Atribui-se ao NO um papel essencial no controle da disseminação fúngica, por associar-se à atividade fungicida de macrófagos (Nascimento *et al.*, 2002). Paradoxalmente, NO também está envolvido na regulação negativa da resposta contra o patógeno. A produção exacerbada de NO por macrófagos ativados na PCM experimental se correlaciona com a menor expressão de moléculas de MHC de classe II por essas células, além da supressão da linfoproliferação estimulada por antígenos fúngicos e por

mitógenos (Bocca *et al.*, 1998; Bocca *et al.*, 1999).

A resposta imunitária humoral não desempenha um papel principal na defesa contra *P. brasiliensis*. Tanto pacientes com PCM aguda como camundongos susceptíveis infectados produzem anticorpos específicos em níveis altos, os quais se correlacionam diretamente com a gravidade da doença (Benard *et al.*, 1997; Calich e Kashino, 1998; Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Pacientes com a forma aguda ou subaguda da doença apresentam um padrão de resposta imunológica de tipo Th2, associado à depressão da resposta imunológica celular, que é muito acentuada nessa forma da doença (Benard *et al.*, 2001). A ativação policlonal de linfócitos B é fenômeno característico na infecção por *P. brasiliensis*, dessa maneira, considera-se que o título de anticorpos específicos seja um parâmetro útil para avaliar o diagnóstico da doença e orientar sua terapêutica, já que há uma queda no título desses anticorpos com o tratamento da PCM (Hamilton, 1998).

Uma característica do estado imunitário de indivíduos infectados por *P. brasiliensis* é a depressão da resposta celular mediada por células T (Peracoli *et al.*, 1982; Jimenez-Finkel e Murphy, 1988). Pacientes com PCM apresentam depressão da resposta linfoproliferativa tanto a mitógenos como a antígenos de *P. brasiliensis* (Benard *et al.*, 1997; Bocca *et al.*, 1998; Bocca *et al.*, 1999; Campanelli *et al.*, 2003). Essa disfunção imunológica tem sido atribuída a diversos mecanismos, tais como: a produção de NO (Bocca *et al.*, 1998; Souto *et al.*, 2000; Nascimento *et al.*, 2002), distúrbios na produção de citocinas por células T (Benard *et al.*, 2001), presença de antígenos solúveis de *P. brasiliensis* (Jimenez-Finkel e Murphy, 1988), aumento da sinalização inibitória via CTLA-4, aumento da apoptose em células recém isoladas ou cultivadas com antígenos de *P. brasiliensis* (Cacere *et al.*, 2002; Campanelli *et al.*, 2003), dentre outros.

Além dos linfócitos Th1 e Th2, um terceiro tipo de células T auxiliares têm sido bastante estudado, as células Th17. No curso da PCM, o envolvimento da resposta de Th17 ainda é pouco definido. Pagliari *et al.* (2011) demonstraram por meio de ensaios imunohistoquímicos a presença de células expressando IL-17 em lesões cutâneas e mucosas de pacientes com PCM. Trabalho conduzido por Castro *et al.* (2013), que buscou caracterizar melhor a resposta imunológica na PCM humana, demonstraram que pacientes com a forma crônica da doença possuem um predomínio do perfil Th17 de resposta. As células do sangue periférico desses pacientes apresentaram alta expressão de ROR γ T, que é um fator transcrição típico de células Th17, maior síntese de IL-17 e IL-22, e alta frequência de células T CD3⁺CD4⁺IL-17⁺. Com relação ao papel de IL-17, há um número crescente de evidências de que células produtoras dessa citocina estejam

envolvidas nas respostas imunológicas a doenças causadas por fungos e a IL-17 foi apontada como uma das principais citocinas que promovem a resistência a esses agentes patogênicos (Romani, 2011). Na infecção experimental por *Histoplasma capsulatum*, Heninger *et al.* (2006) relataram a presença de células produtoras de IFN- γ e IL-17 no granuloma formado em resposta ao fungo, e que a IL-17 é necessária para a sua formação. De fato, o papel que a IL-17 desempenha na formação de granulomas maduros ganhou relevância em alguns modelos de infecção, tais como aqueles de *Mycobacterium* (Okamoto Yoshida *et al.*, 2010). Estudos recentes com modelos de infecções por *Candida albicans* demonstraram que a imunidade protetora envolve a participação de IL-17 de ambas as respostas inata e adaptativa (Hernandez-Santos e Gaffen, 2012; Hernandez-Santos *et al.*, 2013; Sparber e Leibundgut-Landmann, 2015).

Assim como para o papel de Th17, há poucos trabalhos na literatura que relatam sobre a participação das células T reguladoras (Tregs) no curso da PCM. Na PCM humana, o trabalho que demonstra, pela primeira vez, que células T com características fenotípicas – CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ – e funcionais de Tregs, estão presentes no sangue periférico e nas lesões de pacientes com PCM foi publicado em 2006 (Cavassani *et al.*, 2006). Corroborando esses achados, trabalho posterior relata que pacientes com a doença ativa, quando comparados com pacientes tratados ou controles saudáveis, apresentam maior número de células Tregs nos mesmos sítios anteriormente avaliados por Cavassani *et al.* (2006), sugerindo que essas células têm um potencial papel na imunossupressão observada na PCM (Ferreira *et al.*, 2010). Em camundongos, Felonato *et al.* (2012) demonstraram que a redução de células Tregs, mediada pelo tratamento com anticorpos anti-CD25, diminui a gravidade da infecção por *P. brasiliensis*, sugerindo que essas células têm efeitos supressores na resposta inicial de células T em camundongos resistentes e nos mecanismos fungicidas em camundongos suscetíveis. Mais recentemente, resultados de um trabalho do mesmo grupo, conduzido por Bazan *et al.* (2015), que utiliza um modelo de transferência de Tregs combinado com células T CD4⁺Foxp3⁻ em camundongos destituídos de linfócitos, devido à deficiência do gene da recombinase RAG1, mostram uma resposta mais eficiente e balanceada, capaz de limitar o crescimento do patógeno e a inflamação tecidual exacerbada, levando a uma regressão da doença e aumento nas taxas de sobrevivência dos camundongos. Sugerem que, no modelo estudado, as Tregs têm um duplo papel na PCM pulmonar: um efeito deletério por prejudicar a resposta de células T e a erradicação do fungo, e um papel protetor, suprimindo a inflamação tecidual exacerbada. Em relação ao efeito observado no trabalho

publicado anteriormente (Felonato *et al.*, 2012), justificam que o tratamento com anti-CD25 a fim de esgotar as células Tregs não as elimina completamente, uma vez que muitas células Foxp3⁺ possuem baixa ou nenhuma expressão de CD25, e isso pode ser suficiente para o efeito de Treg no balanço na resposta imunológica.

1.3. Adjuvantes e imunomoduladores

Os adjuvantes imunológicos foram originalmente descritos por Ramon, em 1924 (*apud* Awate *et al.*, 2013), como substâncias usadas em combinação com antígeno específico, cujas características permitem acentuação da resposta imunológica, tornando-a mais eficiente, quando comparada àquela promovida pelo antígeno sozinho. A palavra adjuvante vem do latim *adjuvare* que significa ajudar ou auxiliar (O'hagan, 2001; Schijns, 2001; Petrovsky e Aguilar, 2004; Awate *et al.*, 2013).

Os antígenos solúveis são considerados de imunogenicidade baixa, pois são rapidamente degradados ou removidos pelo sistema mononuclear fagocitário, induzindo resposta imunológica pouco evidente (Schijns, 2001; Hunter, 2002). Os adjuvantes podem ser usados com vários propósitos. Entre eles, melhorar a imunogenicidade, diminuir a concentração dos antígenos ou número de injeções necessárias para obtenção da resposta imunológica desejada, modular seletivamente a produção de citocinas e, conseqüentemente, determinar o perfil de resposta imunológica gerada (Mccluskie e Weeratna, 2001; Petrovsky e Aguilar, 2004). Segundo Cox e Coulter (1997), os adjuvantes são classificados de acordo com suas propriedades, sendo a principal, a imunomodulação.

Um adjuvante clássico bastante utilizado em protocolos experimentais é o adjuvante completo de Freund (CFA), cuja a base racional se fundamenta nas observações iniciais de Eugene L. Opie e Jules Freund (1937), que perceberam que cobaias infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* apresentavam uma resposta com altos títulos de anticorpos após imunização, quando comparado aos animais não infectados. No mesmo ano, Freund *et al.* fizeram dois saltos tecnológicos: (1) substituição de *M. tuberculosis* vivos por bacilos mortos e (2) uso de emulsão de água em óleo (Freund *et al.*, 1937). A formulação original do adjuvante completo de Freund (Freund, 1956), usada experimentalmente até hoje, é composta por óleo mineral, Arlacel A (detergente) e *M. tuberculosis* morto, formando uma emulsão do tipo água em óleo. A eficácia desse adjuvante em direcionar respostas para perfil de citocinas de linfócitos Th1 é devida, em parte, a presença dos componentes da micobactéria que levam ao desenvolvimento de

hipersensibilidade retardada (Stills, 2005; Oscherwitz *et al.*, 2006). Vários estudos demonstram que a utilização do CFA está diretamente associada a variedades de alterações no ambiente inflamatório, por ele produzido, que incluem principalmente a formação de granulomas no local de injeção e atrofia muscular, caracterizando assim seu efeito tóxico e, portanto, impeditivo de uso na prática humana (O'hagan, 2001).

Os adjuvantes que contêm alumínio foram descobertos em 1926, sendo utilizado primeiramente na formulação das vacinas contra difteria e tétano e, atualmente, são os mais utilizados em vacinas humanas (Marrack *et al.*, 2009; Olafsdottir *et al.*, 2015). Dentre esses adjuvantes, o alúmen de potássio, que consiste de sulfato de alumínio e potássio, tem sido bastante usado. Os mecanismos de ação desse adjuvante incluem o aumento da duração da resposta imunológica pela formação de um depósito com liberação lenta do antígeno. Acredita-se que este adjuvante promova uma resposta do tipo Th2 e robusta produção de anticorpos (Marrack *et al.*, 2009; Kool *et al.*, 2012; Awate *et al.*, 2013).

Dentre os novos adjuvantes, destaca-se o monofosforil lipídeo (MPL) A, uma forma destoxicada do LPS de *S. minnesota* R595, que foi aprovado nos Estados Unidos para uso como adjuvante em vacinas para seres humanos contra diferentes patógenos, câncer e alergias (Embry *et al.*, 2011). MPLA é um agonista de TLR4, ativa ambas as vias de sinalização: a via dependente da molécula adaptadora MyD88 e dependente de TRAM/TRIF, embora alguns trabalhos mostrem que há uma preferência aparente pela sinalização através da via dependente de TRIF (Mata-Haro *et al.*, 2007).

Hidróxido de alumínio em combinação com MPLA, já citado, também conhecido como AS04, tem sido utilizado com sucesso em vacinas contra o vírus da hepatite B (HBV), contra o papiloma vírus humano (HPV) e o vírus Epstein-Barr (Kundi, 2007; Paavonen *et al.*, 2007). Trabalhos recentes vêm elucidando o mecanismo de ação de AS04 *in vitro* utilizando células humanas e *in vivo* em modelos experimentais murinos (Didierlaurent *et al.*, 2009). Os resultados demonstrados trazem evidências moleculares e celulares da imunogenicidade, eficácia e segurança dessa formulação.

Outro adjuvante em estudo em humanos tem sido descrito, PAM₃CSK₄, um lipopeptídeo triacilado sintético agonista de TLR2/TLR1. Recentemente, alguns trabalhos demonstraram o uso desse agonista sintético como adjuvante em alguns modelos de infecção. Cheng, *et al.* (2011) avaliou adjuvantes na formulação da vacina contra *Chlamydia trachomatis*. Para isso, a proteína principal de membrana externa (Ct-rMOMP) foi formulada com diferentes ligantes de TLR (*Toll-like Receptors* – TLR) e

NOD (*nod-like receptors* – NOD). Os resultados revelaram que PAM₃CSK₄, é um adjuvante candidato para a vacina contra *C. trachomatis*. Alguns autores sugerem que agonistas de TLR2 induzem preferencialmente do tipo Th2 (Toussi e Massari, 2014).

Atualmente, tem-se estudado o uso de vacinas terapêuticas em infecções crônicas de modo a impedir maiores complicações, por reforçar ou ampliar a resposta imunológica específica quando o organismo é incapaz de fazê-lo durante o curso natural da infecção ou quando a terapia antimicrobiana convencional não é suficiente (Autran *et al.*, 2004). O racional dessas abordagens se baseia no fato do sistema imunológico ter a capacidade natural de reconhecer e eliminar agentes estranhos, portanto é um tratamento que visa estimular e fortalecer esta função.

1.4. Antígenos e estratégias de tratamento e profilaxia na PCM experimental

A busca e identificação por componentes fúngicos específicos tem por objetivo proporcionar: (1) uma melhor compreensão da doença e dos mecanismos de imunidade envolvidos na suscetibilidade e proteção do hospedeiro, (2) o conhecimento da biologia do fungo, bem como a identificação de fatores de virulência, (3) o desenvolvimento de testes diagnósticos mais específicos e (4) a exploração terapêutica ou profilática desses antígenos, que poderão ser administrados isoladamente ou em associação à terapia antifúngica convencional, facilitando a eliminação do fungo.

Mais recentemente, as abordagens genômicas e aquelas baseadas no transcriptoma do *P. brasiliensis* revelaram uma ligação entre o metabolismo, morfogênese e resposta ao estresse na adaptação ao hospedeiro. Essas adaptações podem melhorar a virulência do patógeno, mas também pode oferecer oportunidades para o isolamento de potenciais alvos terapêuticos (Romani, 2011). Diferentes estudos têm sido conduzidos com o propósito de elucidar os complexos programas de expressão gênica e tradução proteica que *Paracoccidioides spp.* utilizam para sobreviver quando exposto a condições semelhantes ao encontrado no hospedeiro. Tavares *et al.*, (2007) mostraram, por exemplo, que *P. brasiliensis* regula a expressão de 119 genes durante a fagocitose. Esses genes foram, primeiramente, associados com limitação de glicose e aminoácidos, construção da parede celular e estresse oxidativo. Trabalhos posteriores também investiram esforços para elucidar as moléculas envolvidas na adaptação do fungo. Além da ativação de enzimas envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo, as análises sugerem que há uma mudança na via de metabolismo das células fúngicas (Derengowski *et al.*, 2008; De Arruda Grossklaus *et al.*, 2013; Parente-Rocha *et al.*, 2015).

P. brasiliensis, como outros organismos eucarióticos, apresenta na sua constituição uma multiplicidade de componentes antigênicos (Restrepo *et al.*, 1983), alguns próprios da espécie e outros ortólogos a outras espécies de fungos. Vários pesquisadores têm estudado preparações antigênicas que podem ser extraídos da parede do fungo, obtidos do conteúdo do citoplasma (intracelulares), do filtrado de cultura do fungo (exoantígenos – ExoAg) ou das células lisadas (preparações somáticas – AgSom) (Casotto, 1990; Diniz *et al.*, 1999; Diniz *et al.*, 2001).

A glicoproteína de superfície de 43kDa (gp43), considerada o principal componente antigênico de *P. brasiliensis*, uma vez que é reconhecida por 100% dos soros de pacientes com PCM (Restrepo *et al.*, 1983; Puccia *et al.*, 1986; Puccia *et al.*, 1991; Camargo *et al.*, 1994). Vários estudos sobre o papel da gp43 têm demonstrado seu envolvimento na patogenicidade de *P. brasiliensis*, com ênfase para a ligação à laminina da matriz extracelular (Vicentini *et al.*, 1994) e para a adesão de *P. brasiliensis* à superfície de células epiteliais (Gesztési *et al.*, 1996), facilitando a invasão e disseminação tecidual do fungo. De fato, linhagens de *P. brasiliensis* silenciadas para gp43 são menos aderentes ou internalizadas por macrófagos (Torres *et al.*, 2013).

Curiosamente, em 2006, Ferreira e Almeida mostraram que animais susceptíveis imunizados com células dendríticas pulsadas com gp43 e, posteriormente, infectados com *P. brasiliensis*, apresentam um aumento significativo da carga fúngica quando comparados ao grupo controle não imunizado (Ferreira e Almeida, 2006). Entretanto, isso provavelmente é devido à parte da gp43 que impede ou bloqueia uma resposta apropriada, haja vista que alguns estudos têm mostrado o peptídeo P10 de gp43 como um candidato promissor à vacina contra PCM (Taborda *et al.*, 1998; Marques *et al.*, 2008; Munoz *et al.*, 2014). Ademais, a terapia utilizando DNA plasmideal clonado com o gene que codifica o peptídeo P10 mostrou melhora na infecção por *P. brasiliensis* em camundongos (Rittner *et al.*, 2012).

Proteínas exocelulares são mediadores-chave na interação parasita-hospedeiro. Inúmeras proteínas ou glicoproteínas, com massas moleculares que variam de 17 a 190kDa, são secretadas em cultura por *P. brasiliensis* (ExoAgs). Muitas dessas proteínas são compartilhadas por diferentes cepas do fungo, sendo reconhecidas, em grau variável pelos soros de pacientes (Panunto-Castelo *et al.*, 2003). No entanto, poucos trabalhos têm explorado melhor o papel de tais proteínas na terapia ou profilaxia da PCM experimental.

Com o objetivo de descobrir componentes antigênicos relevantes na resposta imunológica do hospedeiro à infecção, Diniz *et al.* (1999) e (2001) estudaram antígenos

solúveis de leveduras de *P. brasiliensis* fracionados por cromatografia de troca aniônica em sistema FPLC. As frações analisadas eram constituídas de múltiplas proteínas, com massas moleculares que variavam de 18 a 114kDa. Foi demonstrado que a imunização com duas das sete frações analisadas, F0 ou FII, promoveram uma diminuição significativa no número de fungos no pulmão dos animais após a infecção, induziram a produção de IFN- γ e TNF- α , e evitaram a disseminação do fungo para outros órgãos (fígado e baço). Em contraste, camundongos imunizados com a fração FIII desenvolvem uma doença disseminada progressiva para baço e fígado, apresentaram níveis significativos de IFN- γ , IL-10 e TGF- β (Diniz *et al.*, 2004). Corroborando com os dados que mostraram que proteínas da fração F0 eram candidatas à vacina contra a micose em estudo, trabalhos mostraram que a imunização com a proteína recombinante de 27kDa (rPb27), presente na fração F0, promoveu um efeito protetor contra a infecção por *P. brasiliensis* (Reis *et al.*, 2008; Morais *et al.*, 2015). Posteriormente, rPb40, uma proteína imunogênica identificada também na fração F0 (Góes *et al.*, 2005) foi utilizada em associação com rPb27, em adição à terapia com fluconazol, e mostrou um efeito aditivo protetor na PCM (Fernandes *et al.*, 2011a; b). Trabalho mais recente demonstra que a proteção conferida por rPb27 é dependente da sinalização via TLR9 (Morais *et al.*, 2016).

A utilização das terapias adjuvantes, imunoterapias ou vacinas terapêuticas, tem ganhado força no meio clínico, sendo muito empregada no tratamento de cânceres como alternativa complementar a cirurgia, radioterapia ou quimioterapia. Atualmente, tem-se estudado o uso de vacinas terapêuticas em infecções crônicas de modo a impedir maiores complicações, por reforçar ou ampliar a resposta imunológica específica quando o organismo é incapaz de fazê-lo durante o curso natural da infecção ou quando a terapia antimicrobiana convencional não é suficiente (Austran *et al.*, 2004). O racional dessas abordagens se baseia no fato do sistema imunológico ter a capacidade natural de reconhecer e eliminar agentes estranhos, portanto é um tratamento que visa estimular e fortalecer esta função. Glicana, por exemplo, foi utilizada como imunoestimulante no tratamento de pacientes com PCM com relativo sucesso (Meira *et al.*, 1996). De um modo interessante, algumas lectinas, como a lectina de *Artocarpus heterophyllus*, Artin M (Coltri *et al.*, 2008; Coltri *et al.*, 2010), e paracoccina de *P. brasiliensis* (Alegre-Maller *et al.*, 2014; Alegre *et al.*, 2014), promoveram proteção tanto em protocolos profiláticos como em terapêuticos por indução de uma resposta imunológica Th1 por sinalização via TLR. Mais recentemente, foi demonstrado que leveduras de *P. brasiliensis* opsonizadas com anticorpos policlonais contra glicoesfingolípídeos ácidos do fungo é capaz de induzir

o aumento da fagocitose por macrófagos em ensaios *in vitro* e reduz significativamente a carga fúngica de animais infectados tanto em protocolos de terapia e profilaxia (Bueno *et al.*, 2016).

Resultados prévios de nosso grupo têm mostrado que CFA, um indutor bem estabelecido da resposta imunológica do tipo Th1, tem um efeito terapêutico em camundongos infectados com *P. brasiliensis* (De Oliveira *et al.*, 2008). O fato de obtermos proteção de animais previamente infectados injetando apenas CFA, na ausência de antígenos fúngicos, levou-nos a sugerir que esse adjuvante estava modificando a resposta imunitária para antígenos liberados pelo fungo durante o curso da infecção.

No presente estudo, aventamos a hipótese de que adjuvantes indutores de resposta Th1, incluindo alguns liberados para uso em humanos, modificam a resposta imunológica em camundongos infectados com *P. brasiliensis*, gerando uma diminuição de carga fúngica e melhorando o quadro inflamatório pulmonar. Além disso, ventilamos a possibilidade de que o efeito benéfico gerado pelos adjuvantes nos camundongos infectados com *P. brasiliensis* é relacionado a geração ou modificação de resposta imunológica para antígenos que possam ser candidatos a agente terapêutico ou vacinal.

O efeito benéfico dos adjuvantes liberados para uso em seres humanos quando injetado sozinho ou em associação com possíveis antígenos purificados poderá aumentar a resposta protetora contra o fungo, e consistir de uma imunoterapia mais eficiente, abrindo perspectivas de aplicação clínica na PCM, o que justifica o presente trabalho.

2. OBJETIVOS

– Objetivo geral

Identificar adjuvantes liberados para uso em humanos que sozinhos possam reduzir a carga fúngica e associados a antígenos possam induzir uma resposta protetora em um modelo murino de PCM.

Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito benéfico de adjuvantes liberados para uso em humanos ou em testes clínicos em um modelo de tratamento da PCM experimental (Oliveira *et al.*, 2008);
2. Rastrear e identificar, por espectrometria de massa, antígenos proteicos que tenham potencial protetor contra a PCM;
3. Clonar, expressar e purificar as proteínas antigênicas;
4. Analisar a atividade protetora das proteínas recombinantes associadas a adjuvante previamente selecionado no protocolo terapêutico da PCM experimental (Oliveira *et al.*, 2008);
5. Sublocalizar as proteínas analisadas em hifas e leveduras de *P. brasiliensis*;
6. Determinar a expressão diferencial dos genes das proteínas antigênicas estudadas em hifas e leveduras de *P. brasiliensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo de *P. brasiliensis*

Leveduras do isolado 18 de *P. brasiliensis* (Pb18) foram mantidas em ágar YPD (1% de extrato levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar), por 7 dias, a 36°C, tendo sua virulência conservada por passagens periódicas em animais. A escolha de Pb18 foi baseada em sua alta virulência e capacidade de induzir reação granulomatosa (Calich *et al.*, 1985). Pré-inóculos de 2×10^6 células/mL foram adicionados em 50mL de meio de cultura líquido F-12 Nutrient Mixture (HAM) com L-glutamina (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e cultivados a 36°C, sob agitação constante a 100rpm. Leveduras para infecção foram cultivadas por 7 dias, para a produção de antígenos por 15 dias e para extração de RNA total para os procedimentos de clonagem, por 7, 10, 13 ou 15 dias.

Para os experimentos de expressão diferencial do gene que codifica diidrolipoil desidrogenase, leveduras e hifas de *P. brasiliensis* foram obtidas por cultivo em meio líquido, acima citado. As leveduras foram mantidas por cultivo a 36°C, enquanto a forma miceliana foi obtida por cultivo a 25°C. Ambas as culturas foram mantidas nessas condições por 7 dias. Para obtenção da fase de transição de hifa para levedura, cultivou-se as hifas a 25°C, por 18h, alterando-se, em seguida, a temperatura para 36°C, mantendo-se nessa temperatura por 22 horas. Para a transição de levedura para hifa, foi feito o contrário – leveduras foram cultivadas por 18 horas a 36°C e logo após a temperatura foi mantida a 25°C por 22h.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos machos, com idade entre 6 e 8 semanas, da linhagem BALB/c. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) e mantidos no Biotério do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, numa sala com temperatura, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados e livre acesso à água e à ração.

Após completado o procedimento experimental *in vivo* ou *in vitro*, os animais foram anestesiados com 100mg/kg de cetamina (União Química, Embu-Guaçu, Brasil) e 8mg/kg de xilazina (União Química), por via intraperitoneal, e submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Após coleta de material para análise, os animais foram enviados para incineração, conforme as normas de segurança. Todos os procedimentos

foram realizados segundo os preceitos éticos definidos pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, protocolo n° 105/2007.

3.3. Determinação da viabilidade dos fungos

A viabilidade foi determinada pelo método fluorescente (Calich *et al.*, 1979). Brevemente, 100µL de uma suspensão de leveduras em solução salina tamponada com fosfato a 10mM, pH 7,2 (PBS) estéril foram misturados a uma solução contendo 100µL de brometo de etídio (50mg/mL – Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 100µL de diacetato de fluoresceína (2mg/mL – Sigma-Aldrich), preparada no momento do uso. Essa suspensão foi incubada por 10 minutos a 36°C, na ausência de luz. Após o período de incubação, a viabilidade das células fúngicas foi determinada em microscópio de fluorescência, onde fluorescência verde denotou formas vivas ou viáveis e fluorescência vermelha como marcação de leveduras mortas. Apenas as suspensões de leveduras com viabilidade superior a 90% foram utilizadas para infectar camundongos.

3.4. Infecção dos camundongos com leveduras de *P. brasiliensis*

Para preparação dos fungos para os experimentos de infecção, as leveduras foram lavadas e ressuspendidas em 5mL de PBS estéril, aspiradas em seringa descartável de 10mL e passadas por agulha de 25 × 8 para a completa separação dos agregados fúngicos. A viabilidade foi determinada como descrito acima. Para a infecção intratraqueal, a suspensão fúngica foi ajustada para a concentração de 3×10^6 leveduras/mL, sendo injetado 100µL da suspensão. Os camundongos foram anestesiados como descrito no item 3.2. Após aproximadamente 10 minutos, quando os animais se apresentaram insensíveis a dor, foi feita uma pequena incisão longitudinal no pescoço para expor a traqueia, sendo a suspensão fúngica injetada com uma seringa de insulina de 1mL e agulhas Ultra-Fine (Becton, Dickinson Co., Franklin Lakes, EUA), permitindo a dispersão fúngica diretamente nos pulmões. Após a infecção, a incisão foi suturada e os animais foram mantidos aquecidos até acordarem da anestesia.

3.5. Protocolo de tratamento experimental

Foi utilizado um protocolo de tratamento terapêutico descrito previamente por nosso grupo (De Oliveira *et al.*, 2008). Brevemente, vinte dias após a infecção, conforme

descrito acima, os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos de cinco animais e injetados por via subcutânea com 100µL de um dos seguintes adjuvantes: (1) CFA (Sigma-Aldrich), (2) PAM₃CSK₄ (agonista de TLR2 – Invivogen, San Diego, EUA), (3) MPLA de *S. minnesota* (agonista de TLR4 – Invivogen), (4) AS04 ou (5) hidróxido de alumínio [Al(OH)₃]. AS04 e hidróxido de alumínio foram gentilmente cedidos pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. Todos os adjuvantes foram ressuspensos em PBS. CFA foi preparado como uma emulsão (1:1) no veículo. MPLA e PAM₃CSK₄ foram injetados nas doses de 5, 10 ou 20µg/camundongo. A dose de AS04 foi de 5µg de MPLA de *Bordetella pertussis* + 50µg de hidróxido de alumínio /camundongo, conforme descrito por (Didierlaurent *et al.*, 2009) e a de hidróxido de alumínio sozinho foi de 50µg/camundongo.

Para os experimentos de associação do adjuvante MPLA com a terapia medicamentosa, foi utilizado fluconazol (solução injetável para aplicação intravenosa 2mg/mL HalexIstar, Goiânia, Goiás) por via intraperitoneal a 10mg/kg/dia. Resumidamente, vinte dias após a infecção, os animais foram divididos nos seguintes grupos: MPLA – que foram tratados com MPLA a 20µg/camundongo; Fluco 20dpi (20 dias pós infecção – dpi) – animais que receberam fluconazol diariamente, por 30 dias, iniciando-se no dia 20 pós-infecção; Fluco 27dpi – animais que receberam fluconazol diariamente, iniciando-se no dia 27 pós-infecção e Fluco+MPLA – animais que receberam MPLA a 20µg/camundongo no dia 20 pós-infecção e após 7 dias, fluconazol diariamente, conforme demonstrado no quadro 1.

Quadro 1. Protocolo de tratamento dos animais infectados com *P. brasiliensis*.

Grupos	Tratamento		
	MPLA ¹	Início do tratamento com fluconazol ²	
	20 dpi ³	20dpi	27dpi
MPLA			
Fluco 20dpi			
Fluco 27 dpi			
MPLA + Fluco			

¹Dose única de 20µg.

²Tratamento diário até o 50dpi.

³Dias após a infecção.

Um grupo controle, não mostrado na tabela foi injetado apenas com PBS no dia 20 após a infecção.

Para os experimentos utilizando a diidrolipoil desidrogenase recombinante, os animais receberam 10µg da proteína purificada emulsificada em MPLA (20µg

ressuspendidos em 100µL de PBS), ou somente 10µg da proteína emulsificada em 100µL de PBS.

Em todos os experimentos, um grupo controle da infecção foi injetado com PBS estéril, 20 dias após a infecção. Decorridos 30 dias dos tratamentos (50 após a infecção), os animais de cada um dos grupos experimentais foram mortos e tiveram os pulmões assepticamente retirados e pesados.

3.6. Recuperação das leveduras

Os pulmões dos camundongos foram homogeneizados em 1mL de PBS estéril com Ultra-Turrax T25 Basic (IKA Works, Inc., Wilmington, EUA). Aliquotas de 100µL das suspensões diluídas 1:10 foram semeadas, em duplicata, em placas de Petri contendo ágar BHI (Oxoid Limited, Basingstoke, Reino Unido) suplementado com 4% (v/v) de soro bovino fetal (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, EUA). Após sete dias de incubação a 36°C, as colônias de fungos formadas foram contadas e os resultados expressos como números de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido (UFC/g).

3.7. Análise histopatológica

Fragmentos de pulmão dos camundongos foram fixados em formalina 10% por 24h, desidratados, clarificados em xilol, embebidos em parafina e seccionados (6µm). Os cortes foram mantidos em estufa a 60°C para fixação e, após a desparafinização em xilol e reidratação em concentrações decrescentes de álcool, foram corados em hematoxilina-eosina (HE). Os cortes foram utilizados para análise histológica realizadas com o microscópio óptico (Acio photomicroscope – Zeiss, Jena, Alemanha) e as imagens adquiridas com o auxílio do programa ImagePro pela câmera digital *Axio Cam MRc* (Zeiss) acoplada ao microscópio.

3.8. Análise da produção de citocinas pulmonares

Após homogeneização dos pulmões como descrito no item 3.6, o macerado foi centrifugado a $10.000 \times g$, por 5 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram estocados a -20°C. A marcação das citocinas presentes nos sobrenadantes foi realizada com o kit BDTM Cytometric Bead Array (CBA) (Becton, Dickinson Co.), de acordo com as instruções do fabricante.

3.9. Produção, fracionamento e análise eletroforética de antígenos de *P. brasiliensis*

3.9.1 Preparação de antígenos somáticos (AgSom) e exoantígenos (ExoAg) solúveis de *P. brasiliensis*

As preparações antigênicas de *P. brasiliensis* foram obtidas de leveduras de Pb18, que foram cultivadas conforme descrito no item 3.1. As culturas foram centrifugadas a $10.000 \times g$, por 10 minutos, a 4°C. Os sedimentos contendo células fúngicas foram ressuspensos em PBS (aproximadamente 1g de leveduras em 10mL de tampão) e as leveduras rompidas por vibração ultrassônica a 200W, por 1 minuto, em banho de gelo. Esse procedimento foi repetido no mínimo 8 vezes, até se obter um alto grau de ruptura das leveduras, o qual foi verificado através da análise microscópica da suspensão fúngica. A suspensão foi centrifugada a $10.000 \times g$, por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante retirado e filtrado. Essa preparação – AgSom, foi mantida a 4°C até o uso. Já os sobrenadantes das culturas foram concentrados e dialisados contra PBS em dispositivo Amicon, com membrana de exclusão de 3kDa (Millipore, Billerica, EUA), e filtrados em membrana de 0,22 μ M (Millex; Millipore), para a obtenção de ExoAg. As preparações foram quantificadas (*Coomassie Bradford Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, EUA), conforme instruções do fabricante e analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, sob condições dissociantes (SDS-PAGE a 12%).

3.9.2 Análise eletroforética

As análises eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida a 12% em condições dissociantes (SDS-PAGE) em sistema *Mini Protean Tetra* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). Amostras das preparações de ExoAg e AgSom foram ressuspensas em tampão de amostra (Tris-HCl a 0,5M, pH 6,5 contendo 2,5% de SDS, 2,5% de 2-mercaptoetanol e 20% glicerol) e aplicadas no gel. As corridas eletroforéticas tiveram duração aproximada de 1 hora (80-120mA, 200V). Alguns géis foram corados com azul de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue R-250*) para análise do perfil de bandas ou mantidos sem coloração e imediatamente submetidos ao processo de transferência para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF).

3.9.3 Transferência de proteínas para a membrana de PVDF

As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas do gel de poliacrilamida para membranas Amersham Hybond P 0,45 PVDF (GE Healthcare,

Piscataway, EUA). A transferência foi realizada por 2 horas, com uma tensão fixa de 150V e corrente máxima de 300mA, utilizando-se tampão de transferência (1,9% de Tris, 9% glicina e 10% de metanol). A seguir, a membrana foi corada por Ponceau S (0,5g de Ponceau, 2,5mL de ácido acético para 250mL de água) por 3 minutos a fim de observar as bandas transferidas e a eficiência do procedimento. O excesso do corante foi removido por lavagens da membrana com água ultrapura. As membranas contendo as frações alvo para o estudo foram recortadas em frações denominadas 1-3 e mantidas a -20°C até o uso.

3.10. Clonagem gênica e expressão da proteína recombinante

3.10.1 Extração do RNA

RNA total de *P. brasiliensis* foi extraído de leveduras cultivadas, como descrito no item 3.1, utilizando-se pérolas de vidro (Sigma-Aldrich) e TRIzol (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop (ThermoScientific, Wilmington, EUA), sendo a leitura feita nos comprimentos de onda de 280, 260 e 230nm, para obtenção da concentração de RNA/ μ L e contaminação por fenol ou proteínas. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1,5%. Em seguida, 1 μ g de RNA foi submetido ao tratamento com DNase. Para isso, foram adicionados à amostra 1 μ L de tampão da DNase (concentrado 10 vezes), 1 unidade de DNase (1U/ μ l) livre de RNase, e o volume foi ajustado para o volume final de 10 μ L com água ultrapura. Essa reação foi incubada por 15 minutos, a 25°C, seguido da adição de 1 μ L de EDTA a 25mM e uma nova incubação por 10 minutos, a 65°C.

3.10.2 Confecção do DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA por reação. Para sua confecção, à amostra de RNA foi adicionado 1 μ L do iniciador Oligo (dT) 12-18 (0,5 μ g/ μ L), sendo a reação incubada a 70°C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 μ L de tampão da reação (concentrado 5 vezes – 5X *FirstStrand Buffer*), 1 μ L de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatados – 0,1M de *dNTPSet, PCR Grade*), 2 μ L de MgCl₂ e 1 μ l de transcriptase reversa *SuperScript*TM II. A reação foi realizada a 42°C, por 60 minutos e inativada pela incubação da amostra a 70°C, por 15 minutos. A concentração do cDNA de fita simples foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop (ThermoScientific).

3.10.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A etapa inicial da clonagem foi a amplificação do gene de diidrolipoil desidrogenase a partir do cDNA, cuja síntese está descrita acima. Para tanto, preparou-se uma reação de amplificação, utilizando-se 0,1 μ M de cada iniciador: iniciador direto (*Forward primer*) 5'-CATATGTTTCGGCCCTTCTCCC-3' e iniciador inverso (*Reverse primer*) 5'-GGATCCCTAGAAATGAATCGCTTTCG-3', 0,2mM de cada dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 1 unidade da DNA polimerase *high fidelity* (5U/ μ L) (Life Technologies), 5 μ L de tampão da enzima concentrado 10 vezes (Tris-SO₄ a 600mM e persulfato de amônio a 180mM). Essa reação, realizada no termociclador *C1000™ Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories) e foi desenvolvida nas seguintes condições: 94°C por 3 minutos, 35 ciclos com 94°C por 1 minuto, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1,5 minutos, e ao fim destes 30 ciclos, 72°C por 5 minutos. As reações foram mantidas a 10°C até o uso. O fragmento amplificado foi analisado em gel de agarose a 0,8% e purificado utilizando o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare).

3.10.4 Clonagem do gene completo de diidrolipoil desidrogenase

Os produtos de PCR recém-amplificado foram clonados em vetor PCR2.1 TOPO-TA (Life Technologies) para posterior transformação de *E. coli* DH10b eletrocomponentes. Os clones positivos foram confirmados por PCR, como descrito acima. Os plasmídeos foram purificados com o *kit Illustra plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante. Após, os insertos foram retirados de TOPO-TA PCR2.1 com as enzimas de restrição BamHI e *NdeI* (Fermentas) e purificado com o *kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante.

Para clonagem de diidrolipoil desidrogenase em pET28a (Addgene, Cambridge, EUA), digeriu-se 1 μ g de DNA plasmidial com 1 unidade de cada uma das enzimas de restrição *BamHI* e *NdeI*, durante 4 horas, a 37°C, em um volume total de 60 μ L. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8% e a banda correspondente ao plasmídeo linearizado foi recortada e purificada com o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). Posteriormente, o inserto obtido do vetor pCR2.1 TOPO-TA clonado com o gene da diidrolipoil desidrogenase e plasmídeo linearizado foram submetidos à seguinte reação de ligação: 15ng do vetor e 30 ou 45ng do inserto incubados em volume final de 8 μ L. A reação foi mantida a 25°C, durante 30

minutos. Metade do volume da ligação foi utilizada na transformação de células de *E. coli* DH10b competentes que foram plaqueadas em meio LB ágar contendo 50µg de canamicina/mL. Após a confirmação da presença do gene de diidrolipoil desidrogenase nos clones positivos, por PCR, as colônias foram submetidas à extração e purificação do plasmídeo, utilizando-se o *PlasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare). Os produtos da purificação e digestão para linearização do plasmídeo (utilizando 1 unidade das enzimas de restrição *BamHI* somente) e liberação do inserto (utilizando 1 unidade das enzimas de restrição *BamHI* e *NdeI*) foram analisados em gel de agarose a 0,8% e enviados para sequenciamento no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, SP.

3.10.5 Transformação bacteriana

Bactérias competentes para transformação por eletroporação foram obtidas conforme descrito por (Dower *et al.*, 1988). As reações de ligação foram adicionadas em 100µL de uma suspensão de *E. coli* DH10b eletrocompetentes, sendo a mistura incubada em gelo, durante 30 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma cubeta de eletroporação de 0,2mm e submetidas a um pulso elétrico (capacitância de 25µF, resistência de 200Ω e tensão de 2kV). Para recuperação das bactérias, após o choque, em cada tubo foi adicionado 1mL de caldo SOC (triptona a 2% (m/v), extrato de levedura a 0,05% (m/v), NaCl a 0,06% (m/v), KCl a 0,02% (m/v), dextrose a 20mM e MgCl₂ a 10mM, pH 7,0), sendo esses tubos incubados a 37°C, sob agitação constante de 180rpm. Após 1 hora de incubação, as culturas foram centrifugadas a 3.000 × g, por 2 minutos, à temperatura ambiente, e ressuspendidas em 100µL de meio SOC, que foram plaqueados em ágar LB contendo 50µg/mL de canamicina (Gibco) para a seleção dos clones. Bactérias transformadas foram cultivadas em 50 mL de LB líquido contendo o mesmo antibiótico anteriormente citado. Os plasmídeos foram extraídos dessas bactérias com o *kit Illustra plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.10.6 Indução e purificação de proteínas recombinantes – diidrolipoil desidrogenase e Gp43 de *P. brasiliensis*

Bactérias *E. coli* da linhagem BL21 *Rosetta* foram transformadas com o plasmídeo pET-28a contendo o gene de diidrolipoil desidrogenase (pET28A-*DLD*), conforme descrito acima para transformação de bactérias DH10b. Essa mesma linhagem bacteriana

transformada com o gene completo de Gp43 (pET28a-*GP43*) foi gentilmente cedido pelo Dr. Fabrício Freitas Fernandes. Essas bactérias transformadas foram cultivadas em 10mL de caldo LB com canamicina (50µg/mL), a 37°C, de 14 a 16 horas, sob agitação constante (200rpm). Após este período, 200µL foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 2L do mesmo meio seletivo acima citado. Em seguida, os frascos foram incubados a 37°C, sob agitação constante (200rpm), e a absorbância a 600nm foi acompanhada até que atingisse uma densidade óptica (D.O.) entre 0,5 e 0,6. A fim de se induzir a expressão das proteínas pelas bactérias, adicionou-se às culturas IPTG na concentração de 0,8mM para Gp43, 0,4 ou 0,8mM para diidrolipoil desidrogenase. As diferentes culturas realizadas foram centrifugadas a $10.000 \times g$, por 5 minutos, a 4°C. Os sedimentos bacterianos obtidos foram pesados, ressuspensos para uma concentração de 40% (m/v) em tampão de lise (NaH₂PO₄ a 50mM, NaCl a 300mM e imidazol a 20mM) e sonicados a 200W, em banho de gelo com 6 pulsos de 30 segundos cada. Nesta etapa, o sedimento e sobrenadante foram armazenados e analisados em SDS-PAGE a 12%.

Para a solubilização e purificação dos corpúsculos de inclusão, após a lise do sedimento bacteriano por sonicação, como descrito acima, o material foi centrifugado a $10.000 \times g$, por 5 minutos, à temperatura ambiente, e o sedimento bacteriano lavado cinco vezes, por centrifugação, com solução de NaH₂PO₄ a 50mM e NaCl a 300mM contendo Triton X-100 a 1% (v/v), 2-mercaptoetanol a 2mM, imidazol a 20mM e ureia a 2M, pH 8.0. Esse sedimento foi, então, ressuspensado em tampão de desnaturação, contendo NaH₂PO₄ a 50mM, NaCl a 300mM e ureia a 7M, durante 2 horas, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após esse período, foi adicionado L-arginina a 2mM e incubado por mais 1 hora, à temperatura ambiente. Essa preparação foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP (GE Healthcare). O material não adsorvido à coluna foi retirado com o tampão de lise contendo 20mM de imidazol e 7M de ureia (20 volumes de coluna). O material adsorvido foi eluído com o mesmo tampão contendo 300mM de imidazol. As proteínas recombinantes purificadas foram analisadas por SDS-PAGE a 12%.

3.11. Ensaio *in vitro* e *in vivo* utilizando frações antigênicas ou diidrolipoil desidrogenase recombinante

3.11.1 Detecção de mensagens para citocinas por RT-PCR em tempo real

- Extração de RNA total de células esplênicas

Para a separação de células esplênicas totais de animais controle (somente infectados), tratados com MPLA (20µg/camundongo) ou CFA, os baços foram coletados

e colocados em placas de Petri de 22mm de diâmetro (Corning, Nova York, EUA) estéreis contendo 2mL de meio RPMI incompleto (sem suplementação). Com o auxílio de pinças estéreis, os baços foram divulsionados separadamente para obtenção de uma suspensão celular homogênea. As suspensões celulares foram destituídas de hemácias pela incubação com tampão de lise Ack (150mM de NH_4Cl , 10mM de KHCO_3 e 1mM de EDTA, pH 7,3), por 5 minutos, a 4°C. Após a contagem das células em câmara de Neubauer, foi adicionado RPMI completo, as células foram distribuídas em placas de cultura de 48 poços (BD Biosciences), cultivadas na ausência ou presença de ExoAg ou AgSom, na concentração de 10 ou 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a 37°C, em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO_2 . Após 48h de cultura, RNAm total das células foram extraídos com TRIzol (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Após essa fase, os passos seguintes foram os mesmos descritos para o procedimento de síntese de cDNA, como descrito no item 3.10.2.

– PCR em tempo real

Para essas reações, 200ng de cDNA/ μL foram utilizados como molde para a amplificação do alvo específico. A reação foi realizada com 1 μL de cada par de iniciadores a 10 μM (Tabela 1), 1 μL da amostra de cDNA, 12,5 μL de *Platinum SYBR Green pPCRSuperMix-UDG with ROX* (Invitrogen) e 9,5 μL de água ultrapura. As reações foram realizadas no aparelho Rotor-gene 6000 (Corbett Life Science, Mortlake, Austrália) e as análises realizadas no Rotor-Gene 6000 Series Software (Corbett Life Science). Cada ciclo foi composto de desnaturação por 30 segundos, a 94°C, anelamento por 30 segundos, com temperaturas que variaram a depender do par de iniciadores usados (Tabela 1) e extensão por 30 segundos, a 72°C. A amplificação da β -actina foi usada como controle da integridade das amostras. As sequências e as temperaturas de anelamento de cada par de iniciadores usados na RT-PCR em tempo real estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para RT-PCR em tempo real e suas respectivas temperaturas de anelamento

Nome do iniciador	Sequência	Temperatura de anelamento (°C)
IL-6 F ¹	5'-CGGCAAACCTAGTGCGTTAT- 3'	56
IL-6 R ²	5'-TCTGACCACAGTGAGGAATGTC- 3'	
IFN- γ F	5'-GATATCTGGAGGAACTGGCAA- 3'	58
IFN- γ R	5'-GCTCTGCAGGATTTTCATGTC- 3'	
IL-12 F	5'-AGCACCCAGCTTCTTCATCAGG-3'	58
IL-12 R	5'-GCGCTGGATTCTGAACAAAG-3'	
TNF- α F	5'-TGTGCTCAGAGCTTCAACAA- 3'	56
TNF- α R	5'-CTTGATGGTGGTGCATGAGA- 3'	
TGF- β F	5'-GCTGAACCAAGGAGACGGAAT- 3'	58
TGF- β R	5'-GCTGATCCCGTTGATTTCCA- 3'	
Foxp3 F	5'-ACAACCTGAGCCTGCACAAGT- 3'	58
Foxp3 R	5'-GCCACCTTTTCTTGTTTTG- 3'	
IL-10 F	5'-TGGACAACATACTGCTAACCG- 3'	58
IL-10 R	5'-GGATCATTTCCGATAAGGCT- 3'	
IL-17 F	5'-TGCCCTCCACAATGAAAAGA- 3'	56
IL-17 R	5'-AACACGAAGCAGTTTGGGAC- 3'	
TGF- β F	5'-GCTGAACCAAGGAGACGGAAT- 3'	56
TGF- β R	5'-GCTGATCCCGTTGATTTCCA- 3'	
iNOS F	5'-GGAGCGAGTTGTGGATTGTC- 3'	58
iNOS R	5'-GTGAGGCCTTGGCTGAGTGAG- 3'	
β -actina F	5'-AGCTGCGTTTTACACCCCTTT- 3'	58
β -actina R	5'-AAGCCATGCCAATGTTGTCT- 3'	

¹F - iniciador direto (*Forward primer*)

²R - iniciador inverso (*Reverse primer*)

3.11.2 *Reação de hipersensibilidade retardada (DTH)*

Para esses experimentos, foram usados camundongos BALB/c previamente infectados e posteriormente tratados, conforme descrito no item 3.4. Trinta dias após o tratamento, ou seja, cinquenta dias após a infecção, a reação de DTH foi induzida inoculando-se 50 μ g de AgSom ou ExoAg no coxim plantar da pata traseira esquerda dos camundongos. Como controle, injetou-se 50 μ L de PBS no coxim plantar da pata contralateral de cada camundongo. A avaliação do edema foi feita com o auxílio de um paquímetro, e a diferença entre as medidas das patas esquerda e direita dos animais, em milímetros (mm), foi calculada 24, 72, 48 e 120h após a inoculação.

3.11.3 *Ensaio de linfoproliferação de linfócitos isolados de animais tratados com MPLA e estimulados com diferentes frações antigênicas de P. brasiliensis*

– Cultivo de macrófago de linhagem J774

Células da linhagem J774 foram cultivadas em garrafas de cultura de 75cm² (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA), num volume final de 15mL de meio RPMI completo (RPMI suplementado com 10% de SBF, 100mM de piruvato de sódio, 10mM

de β -mercaptoetanol, 100U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina e 100mM de aminoácidos não essenciais). A garrafa foi então incubada em estufa a 37°C, com ar umidificado e acrescido de 5% CO₂. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação em microscópio invertido Nikon TS-100 e subcultivadas por meio de tripsinização, quando a densidade de células formava uma monocamada confluenta.

– Separação de células não aderentes do baço de animais tratados com MPLA

Os baços foram coletados e processados conforme descrito no item 3.11.1. Após lise com Ack, as células totais do baço foram distribuídas em garrafas de cultura de 75cm² (BD Biosciences) e mantidas em cultura durante 45 minutos, a 37°C, em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂. Logo em seguida, as células não aderentes foram coletadas. Após a contagem das células em câmara de Neubauer, foi adicionado RPMI completo e as células colocadas em cocultura com macrófagos J774.

– Ensaio de cocultura de macrófagos e células não aderentes do baço

A fim de verificar se as frações antigênicas induziam proliferação de linfócitos de animais tratados com MPLA, primeiramente, foram realizadas culturas nas quais macrófagos de linhagem J774 (1 × 10⁵/poço) foram estimulados com as frações 1-3, tanto de AgSom quanto de ExoAg, por 24h, em placa de 24 poços. Após esse período de estimulação, aos poços foram adicionadas células não aderentes (1 × 10⁶/poço) do baço de animais tratados com MPLA, que permaneceram em cocultura por 48h. Posteriormente essas células não aderentes foram marcadas com anticorpos e analisadas por citometria de fluxo.

– Marcação com anticorpos de superfície e intracelulares e análise por citometria de fluxo

Após o período de 48h de estimulação da cocultura de células, a placa foi centrifugada a 300 × g, 4°C, por 10 minutos, e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C, para posterior análise de citocinas. Cerca de 2 × 10⁶ células foram coletadas e distribuídas em tubos para citometria em um volume de 100 μ L/tubo e incubadas durante 40 minutos, a 4°C, com anticorpo contra CD16/CD32 de camundongo (*Fc Block*, BD Bioscience), na concentração de 0,5 μ g/10⁶ células, para bloqueio de receptores de Fc. Posteriormente, essas células foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais de interesse (0,5 a 0,75 μ g de anticorpo para 1 × 10⁶ células) contra CD3

marcado com APC-Cy7, durante 30 minutos, a 4°C, no escuro. Após o período de incubação, as células foram lavadas com 2mL de PBS contendo 2% de soro bovino fetal (SBF), centrifugadas a $300 \times g$, 4°C, por 10 minutos. Após a marcação do anticorpo de superfície de interesse, procedeu-se à marcação intracelular com o anticorpo antiproteína nuclear Ki67 marcado com FITC, utilizando o *kit Mouse Foxp3 Buffer Set* (BD Pharmingen™) para fixação e permeabilização das células, segundo orientações do fabricante. Para remoção do excesso de anticorpos, as células foram lavadas duas vezes com PBS, por centrifugação a $300 \times g$, 4°C, por 10 minutos, e fixadas em 200µL de formalina a 1%. As preparações celulares foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Bioscience). As células foram selecionadas de acordo com parâmetros de tamanho (FSC – *Forward Scatter*), granularidade (SSC – *Side Scatter*) e intensidade de fluorescência dos anticorpos. A porcentagem de células duplo positivas foi determinada por *dot plot*, dentro da região de linfócitos.

3.11.4 Ensaio de fagocitose/ atividade fungicida

Macrófagos da cavidade peritoneal foram obtidos de camundongos BALB/c, 72 horas após injeção de tioglicolato à 3%, por lavagem da cavidade peritoneal. Cerca de 1×10^6 macrófagos foram infectados com 3×10^5 leveduras de *P. brasiliensis* e estimulados ou não com 100µg de diidrolipoil desidrogenase. As células foram cocultivadas por 4h em RPMI-completo, a 37°C, em estufa com 5% de CO₂, em placas de cultura de 24 poços para permitir a adesão e ingestão fúngica. Logo em seguida, os sobrenadantes das culturas foram aspirados e as células foram lavadas com RPMI-incompleto a fim de remover as células que não se aderiram. Nesta etapa, alguns poços foram lavados com água destilada previamente autoclavada a fim de se lisar os macrófagos. As suspensões foram coletadas e semeadas em placas de petri contendo meio BHI ágar. Outros poços foram mantidos por mais 20h, e então os macrófagos foram lisados conforme descrito anteriormente. O número de UFC foi contado e expresso como UFC/mL.

3.11.5 Produção de anticorpos policlonais antiidrolipoil desidrogenase

Com a proteína purificada, foi produzido anticorpo policlonal em camundongos BALB/c machos. Para isso, a proteína foi inoculada por via subcutânea, intercalando as inoculações a cada sete dias, sendo que na primeira inoculação, 10µg da proteína foi emulsificada com CFA e nas seguintes com o adjuvante incompleto de Freund.

Decorridos 15 dias da última inoculação foi realizada a sangria total e o soro obtido foi titulado, aliquotado e estocado a -70°C .

3.11.6 Microscopia eletrônica de transmissão para localização subcelular de diidrolipoil desidrogenase

Para realizar a localização de diidrolipoil desidrogenase, hifas e leveduras foram cultivadas como descrito no item 3.1. Essas células foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído a 3,7% tamponado com PBS, por 15 minutos. As células foram lavadas com PBS e ressuspensas em glutaraldeído a 0,05% tamponado com PBS e incubadas à temperatura ambiente. Após 15 minutos as células foram centrifugadas a $5.000 \times g$, por 5 minutos, à temperatura ambiente, e lavadas 3 vezes com 1mL de PBS. Em seguida, as células foram ressuspensas em Triton X-100 a 0,1% tamponado com PBS, incubadas à temperatura ambiente, por 45 minutos, em seguida, centrifugadas a $5.000 \times g$, por 5 minutos, e lavadas com 1mL de PBS. As amostras foram incubadas com 1mL PBS-BSA a 1%, à temperatura ambiente. Após 45 minutos, as células foram centrifugadas $3.000 \times g$, por 5 minutos e 800 μL foram retirados. As células foram ressuspensas nos 200 μL restantes, e nestes foram adicionados 4 μL (1:500) do anticorpo primário policlonal antiidrolipoil desidrogenase recombinante, por 1 hora, à temperatura ambiente, sob leve agitação. As células foram lavadas com PBS-BSA a 1% 4 vezes, com 5 minutos de incubação para cada lavagem. Às células foi adicionado o anticorpo secundário *nanogold* (anticorpo IgG de camundongo conjugado com ouro coloidal; Nanoprobes, Yaphank, NY, EUA), sendo a reação incubada por 1 hora, à temperatura ambiente, sob leve agitação. Após este período as células foram lavadas com PBS-BSA a 1% 5 vezes, com 5 minutos de incubação para cada lavagem. As células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato (EM Sciences, Hatfield, PA, EUA) a 0,1M, pH 7,4, por 1 hora. Após fixação, as células foram lavadas com tampão cacodilato (EM Sciences) a 0,1M, pH 7,4, e incubadas a 4°C , por 18 horas. Subsequentemente, as células foram lavadas 5 vezes em água Milli-Q. O tratamento posterior das células seguiu o protocolo de *GoldEnhancement* (Nanoprobes), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram fixadas com cola de prata sobre suporte metálico e recoberta com ouro (*BAL-TEC-SCD 050-Sputter Coater*). Finalmente, os cortes foram observados com o microscópio de transmissão JEM – 100 CXII (Jeol, Peabody, MA, EUA).

3.11.7 Análise da expressão diferencial do gene que codifica diidrolipoil desidrogenase por RT-PCR em tempo real

O padrão de expressão gênica de diidrolipoil desidrogenase foi feito com hifas, leveduras de *P. brasiliensis*, e nas transições de hifa-levedura e levedura-hifa. Para isso, o RNA total de *P. brasiliensis* dessas foram foi extraído para a síntese do cDNA, conforme descrito no item 3.10.2. Foram desenhados iniciadores específicos para a reação de PCR em tempo real – iniciador direto - 5'-GGTTTGGACAAGGTCGG-3' e reverso 5'-CATGGCCGTAGCCCTTC-3'. O ensaio foi realizado utilizando o *Kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX* (Life Technologies) de acordo com as condições do fabricante, como descrito no item 3.11.1. A amplificação dos genes de β -actina, iniciador direto 5'-GGATGAGGAGATGGATTATGG-3' e inverso 5'-GAAACACTCGACGCACACGAC-3', e β -tubulina, iniciador direto 5'-GTGGACCAGGTGATCGATGT-3' e inverso 5'-ACCCTGGAGGCAGTCACA-3', foram usadas como controle da integridade das amostras e normalizadora das reações.

Uma alíquota das culturas de *P. brasiliensis* foi retirada e submetida à coloração com Calcofluor White (Sigma Aldrich) a 10 μ g/mL por 30 minutos a 37°C para análise das morfologias fúngicas por microscopia de fluorescência.

3.11.8 Western blotting

As amostras de ExoAg ou de diidrolipoil desidrogenase recombinante foram transferidas para a membrana de PVDF (GE Healthcare), conforme descrito no item 3.9.3. Após transferência, as membranas foram incubadas com tampão de bloqueio [gelatina a 3% em solução salina tamponada com Tris-HCl a 20mM, pH 7,6 (TBS) acrescida de Tween-20 a 0,05% (TBST)], a 4°C. Após 16h, as membranas foram lavadas 5 vezes com TBST, 5 minutos cada lavagem, e incubadas com anticorpo policlonal de camundongo antiidrolipoil desidrogenase recombinante, diluído 1:1000 em TBST contendo gelatina a 1%, à temperatura ambiente, sob agitação constante, por 4h. Logo após, as membranas foram lavadas como descrito acima e incubadas por 2h com o anticorpo secundário – anticorpo de coelho contra IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído 1:5000, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Os anticorpos foram diluídos em TBST contendo gelatina a 1%. Após lavagens das membranas, as reações foram reveladas durante 5 minutos no escuro com o substrato 3'3-diaminobenzidina

(DAB) (Sigma Aldrich). Ao final, as membranas foram lavadas em água destilada para interromper a reação, e colocadas para secar à temperatura ambiente.

3.12. Análise estatística

A determinação estatística das diferenças entre as médias dos grupos experimentais foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey, utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, EUA). Diferenças com $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4. RESULTADOS

4.1. Tratamento da PCM experimental

Dados prévios de nosso grupo têm mostrado que CFA, um potente adjuvante indutor de resposta do padrão Th1, tem potencial imunoterapêutico na PCM experimental, levando a uma diminuição acentuada da carga fúngica e melhora do quadro inflamatório (De Oliveira *et al.*, 2008). O fato de obtermos melhora dos animais infectados com *P. brasiliensis* apenas injetando uma preparação de adjuvante, que induz resposta do padrão Th1, desprovida de antígenos fúngicos, sugeriu-nos que estava se desenvolvendo uma mudança de resposta que revertia a resposta imunitária para antígenos fúngicos durante o curso da infecção.

Como o tratamento com CFA é eficiente na redução da carga fúngica na PCM experimental, utilizamos, inicialmente, esse adjuvante para ajuste das condições experimentais e uso como controle da terapia. Conforme esperado, o tratamento com CFA, vinte dias após a infecção, reduziu significativamente a carga fúngica, após trinta dias do tratamento, determinada pela contagem de UFC no pulmão (figura 1). Esses resultados permitem sugerir que após os 20 dias de infecção, os animais controles continuam a permitir a replicação das leveduras de *P. brasiliensis*, ao contrário do grupo tratado com CFA que controla a infecção. A contagem de UFC em animais infectados ou submetidos à terapia foi também um parâmetro importante para o controle das respostas nos animais nos quais foi induzida a DTH com as diferentes preparações antigênicas.

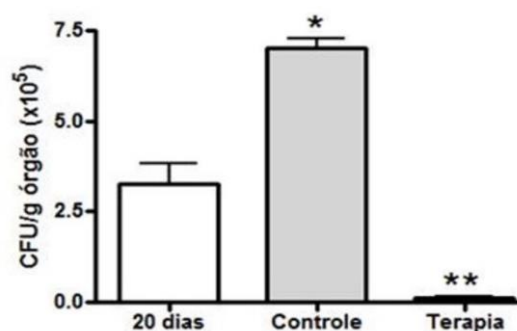


Figura 1. Camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com CFA tem redução significativa na carga fúngica. Camundongos BALB/c foram infectados por via intratraqueal com 3×10^5 leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18). Vinte dias após infecção (20 dias), um grupo foi submetido à eutanásia e outros dois grupos foram tratados com CFA (Terapia) ou PBS (Controle). Os dois grupos tratados foram mantidos vivos por 30 dias. A carga fúngica dos animais foi determinada a partir do homogenato do pulmão e expressa quanto ao número de UFC por grama de tecido pulmonar. Dados representam a média \pm o desvio

padrão dos resultados obtidos de cada grupo. Asterisco indica $p < 0,05$ em relação ao grupo 20 dias, enquanto dois asteriscos indicam $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. Os animais controles continuaram a ter um aumento de carga fúngica após os 20 dias de infecção, ao contrário do grupo terapia que teve uma diminuição significativamente do número de UFC.

4.2. Separação de preparações antigênicas de *P. brasiliensis* e indução de hipersensibilidade retardada em animais tratados com CFA

A fim de se isolar e caracterizar componentes antigênicos de *P. brasiliensis*, propôs-se a separação de antígenos totais que pudessem ter associação com a resposta imunológica protetora induzida em camundongos infectados cronicamente e tratados, inicialmente, com CFA. Para isso, isolamos antígenos somáticos (AgSom) e exoantígenos (ExoAg) de leveduras de Pb18 mantidas em cultura em meio líquido HAM-F12, por 15 dias. A análise eletroforética dessas preparações revelou um perfil complexo de bandas com diferentes massas moleculares para AgSom (figura 2A). Na preparação de ExoAg, destacam-se, como majoritárias, a banda de aproximadamente 60kDa, e duas bandas de aproximadamente 85 e 90kDa (figura 2B).

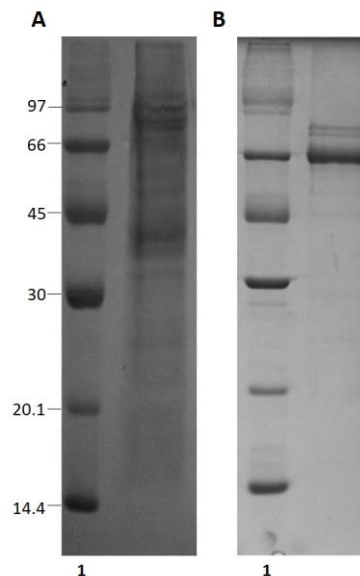


Figura 2. SDS-PAGE das preparações antigênicas da cepa virulenta Pb18. Leveduras de *P. brasiliensis* foram cultivadas em meio líquido HAM F-12, por 15 dias, a 36°C, a 100rpm. Após esse período, a cultura foi centrifugada a $10.000 \times g$. O sedimento foi lavado com PBS por centrifugação ($10.000 \times g$), sonificado e centrifugado nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante da suspensão de leveduras lisadas foi filtrado e usado como fonte de antígenos somáticos (**AgSom**) (A). Já sobrenadante da cultura, contendo exoantígenos (**ExoAg**) (B), foi concentrado e dialisado em dispositivo Amicon, com membrana de exclusão de 3kDa. Gel corado com azul de Coomassie. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (raia 1 de ambos os géis) está indicada na figura (expressa em kDa).

Inicialmente, avaliamos se as preparações antigênicas poderiam induzir uma ativação celular *in vivo* (DTH). Para isso, camundongos *naive* e infectados cronicamente, submetidos ou não ao tratamento com CFA, foram desafiados com essas preparações no coxim plantar. As respostas foram medidas pela diferença de inchaço da pata que foi injetada com antígenos em relação à pata contralateral, injetada com PBS, 24, 48, 72 e 120h após injeção. Como observado na figura 3, os camundongos tratados com CFA tiveram uma DTH mais evidente quando comparado aos camundongos controle – sem tratamento, principalmente no tempo de 24 e 48h após a inoculação. Ambos os grupos – controle e terapia – tiveram respostas para ambas as preparações significativamente maiores quando comparados aos animais não infectados – *naive*.

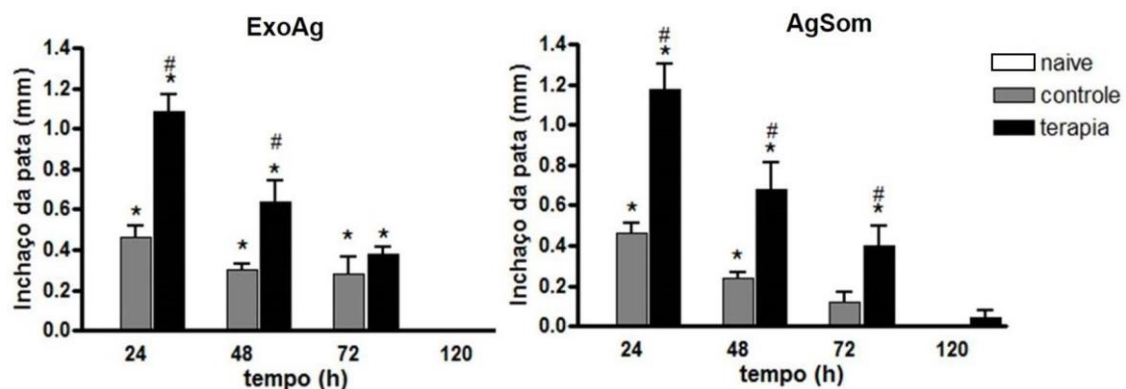


Figura 3. Reação de hipersensibilidade retardada induzida por preparações de exoantígenos (ExoAg) e antígenos somáticos (AgSom) em camundongos infectados cronicamente, submetidos ou não à terapia com CFA. Camundongos foram infectados e tratados como descrito na legenda da figura 1 (terapia). Um grupo de animais foi infectado e injetado apenas com PBS, ao invés de CFA (controle). Após 30 dias do tratamento, os grupos terapia e controle, bem como um grupo de animais não infectados (*naive*), foram inoculados com 50µg de AgSom ou ExoAg no coxim plantar esquerdo da pata traseira. O coxim plantar da pata contralateral foi inoculado com PBS. O inchaço das patas foi determinado pela diferença de medidas entre as patas direita e esquerda. Asterisco indica $p < 0,05$ em relação ao grupo *naive*, enquanto cerquilha indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Os camundongos tratados com CFA tiveram uma DTH significativamente maior que a dos camundongos controle – sem tratamento.

Tomados em conjunto esses resultados, sugere-se que as preparações possam conter alvos potenciais para o estudo da ativação celular no curso da PCM experimental.

4.3. Rastreamento de adjuvantes promissores para o tratamento da PCM experimental

Apesar de CFA ter efeitos terapêuticos na PCM experimental (De Oliveira *et al.*, 2008), ele apresenta efeitos tóxicos que tornam impeditivo o seu uso em seres humanos (Billiau e Matthys, 2001; O'hagan, 2001; Stills, 2005).

A fim de selecionar os adjuvantes que pudessem apresentar duas características, quais sejam, (1) gerar ou modificar uma resposta imunológica em animais infectados cronicamente com *P. brasiliensis*, levando a diminuição de carga fúngica e lesão pulmonar e (2) ser, possivelmente, aplicável à terapêutica humana, foi realizado um experimento com quatro adjuvantes diferentes: MPLA de *S. minnesota*, agonista de TLR4, PAM₃CSK₄, - um lipopeptídeo triacilado sintético agonista de TLR2, AS04 (que contém 5µg de MPLA de *B. pertussis* e 50µg de hidróxido de alumínio) e hidróxido de alumínio.

Neste ensaio, vinte dias após a infecção, os camundongos receberam os tratamentos e, após 30 dias, foi avaliada a quantidade de fungos recuperados nos pulmões. Como demonstrado na figura 4, quando o número de UFC dos animais que receberam o tratamento com MPLA é comparado aos animais controle, nota-se uma redução significativa de fungos nos pulmões (de $5,05 \times 10^5$ UFC/g \pm 1,23 para $0,47 \times 10^5$ UFC/g \pm 0,29). Este número é comparável ao controle da terapia utilizada no experimento – CFA ($0,61 \times 10^5$ UFC/g \pm 0,36), dado não observado para os animais que receberam o tratamento com PAM₃CSK₄ ($5,53 \times 10^5$ UFC/g \pm 2,63), AS04 ($6,67 \times 10^5$ UFC/g \pm 2,29) e hidróxido de alumínio ($4,83 \times 10^5$ UFC/g \pm 1,47). Outras concentrações dos adjuvantes MPLA e PAM₃CSK₄ foram testadas, 5 e 10µg/camundongo, e não apresentaram diferenças significativas quando avaliado UFC ou quadro histopatológico (dados não mostrados).

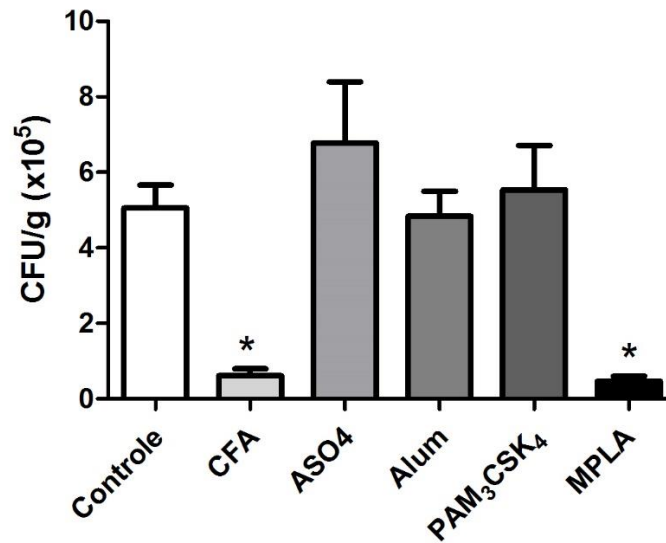


Figura 4. Terapia com MPLA diminui a carga fúngica pulmonar de animais infectados com *P. brasiliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados por via intratraqueal com 3×10^5 leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18). Vinte dias após infecção, os animais foram tratados, por via subcutânea, com CFA (100 μ L, emulsificado em PBS na proporção 1:1), ASO4 (5 μ g de MPLA de *B. pertussis* e 50 μ g de hidróxido de alumínio), hidróxido de alumínio (50 μ g), MPLA ou PAM₃CSK₄ (ambos a 20 μ g/ camundongo) ou mantidos sem tratamento (**controle**). A determinação de carga fúngica foi feita 30 dias após o tratamento. Os macerados dos pulmões dos animais foram usados para contagem de UFC. Dados representam a média \pm o desvio padrão dos resultados de cada grupo. Asterisco indica $p < 0,05$ em relação ao controle. MPLA, mas não os outros adjuvantes testados, que são liberados para uso em seres humanos, induz uma diminuição de carga fúngica similar à observada para CFA, sugerindo que MPLA pode ser eficiente no tratamento de PCM.

Acrescidos aos resultados de UFC, a análise das lâminas de histologia revelou que os animais tratados com CFA e MPLA apresentaram maior preservação do tecido pulmonar, com granulomas bem estruturados e compactos (figura 5). Já para aqueles animais que receberam o tratamento com ASO4, hidróxido de alumínio ou PAM₃CSK₄, verifica-se que os granulomas dos pulmões desses animais foram pouco delimitados e bastante difusos, com a presença de células fúngicas espalhadas pelo tecido e muitos focos de inflamação (figura 5).

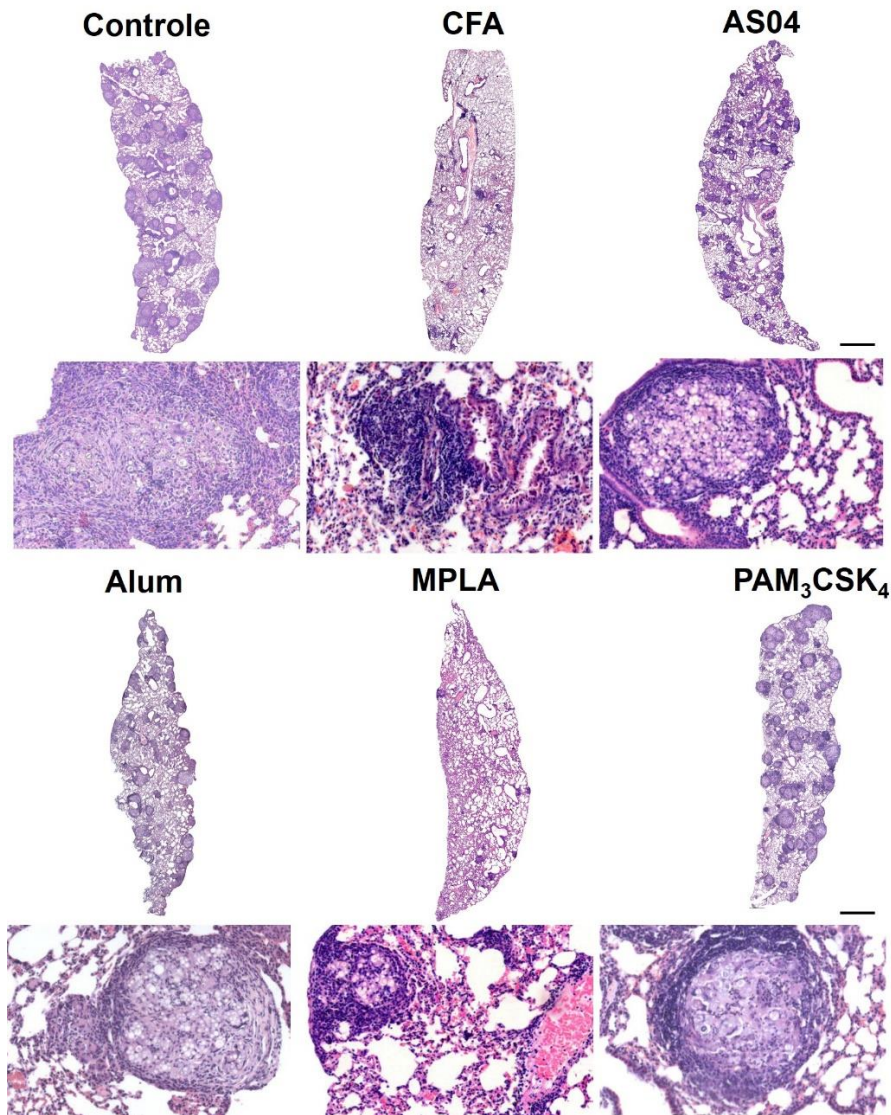


Figura 5. Histologia do pulmão de camundongos BALB/c submetidos à terapia com diferentes adjuvantes. Camundongos BALB/c foram infectados por via intratraqueal com 3×10^5 leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18). Vinte dias após a infecção, os animais foram tratados conforme descrito na legenda da figura 4. Os animais foram mortos 30 dias após o tratamento e parte do pulmão foi removida e processada para as análises histológicas. As lâminas foram coradas com HE. As imagens foram capturadas e digitalizadas pelo programa ImagePro. A escala dos cortes está identificada pela linha preta e corresponde a 1mm. As imagens da região inferior da figura são correspondentes a uma região escolhida ao acaso.

Uma vez que a terapia MPLA diminuiu claramente a carga fúngica e preservou o parênquima pulmonar de animais infectados, determinamos a concentração de citocinas pró- e anti-inflamatórias no sobrenadante de tecido pulmonar de camundongos infectados com *P. brasiliensis* que foram tratados ou não com CFA ou MPLA. Curiosamente, elevadas concentrações de citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF- α foram observadas no macerado de pulmão de camundongos infectados e tratados com CFA ou MPLA quando

comparado com as concentrações em camundongos controle (figura 6B e C). Em contraste, os camundongos controle apresentaram concentrações significativamente maiores de IL-10 e IL-4 do que aquelas de animais tratados com MPLA e com CFA (figura 6F e G). Não houve diferenças significativas nas concentrações das citocinas IL-2, IL-6 e IL-17 entre os grupos (figura 6A, D e E).

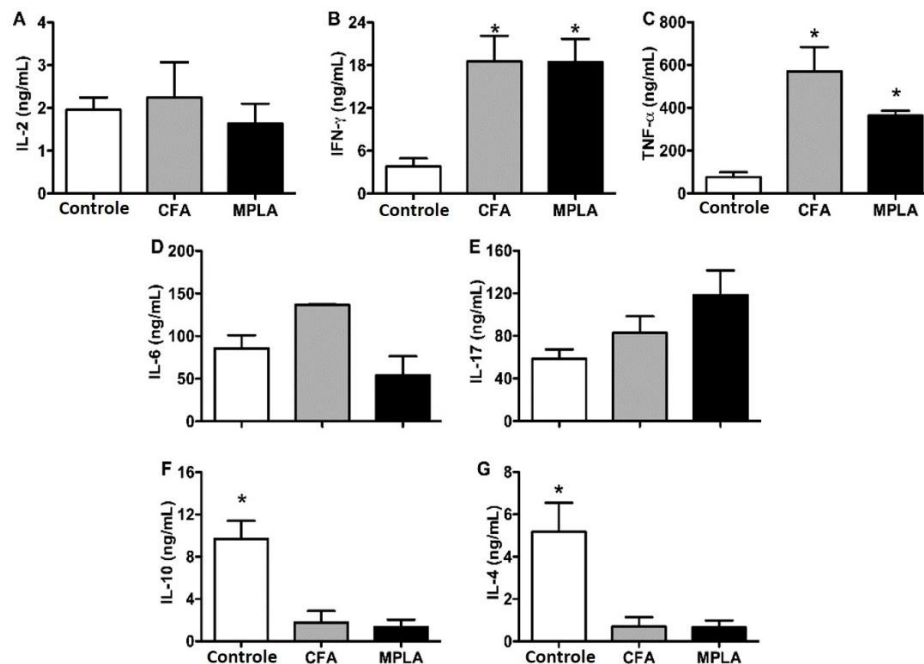


Figura 6. MPLA induz um perfil de citocinas pró-inflamatórias em camundongos infectados com *P. brasiliensis*. Camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* foram injetados CFA ou MPLA no dia 20 após a infecção ou mantidos sem tratamento (controle). O homogenato pulmonar foi analisado 30 dias após o tratamento, ou seja, 50 dias após a infecção, a fim de determinar a concentração de (A) IL-2, (B) IFN- γ , (C) TNF- α , (D) IL-6, (E) IL-17, (F) IL-10 e (G) IL-4. As amostras são de cinco animais por grupo e os resultados representam valores da média \pm desvio padrão. Asterisco indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. MPLA, similarmente à CFA, induz um perfil de citocina pró-inflamatório, revertendo o perfil mais anti-inflamatório visto nos animais não tratados.

Nesta etapa, aventamos a hipótese de que a associação desse indutor de resposta imunológica e a administração de medicação amplamente utilizado em pacientes com PCM pudesse ser benéfica em nosso protocolo terapêutico. Neste experimento, utilizamos fluconazol por via intraperitoneal, diariamente, a 10mg/kg/dia, seguindo o protocolo experimental de tratamento de 30 dias da PCM, como anteriormente utilizado.

Como esperado, o grupo de animais tratados com MPLA teve uma baixa carga fúngica ($0,05 \times 10^5$ UFC/g \pm 0,03) quando comparada ao controle ($5,06 \times 10^5$ UFC/g \pm

3,98). Da mesma forma, o tratamento com fluconazol, 20 ou 27 após a infecção, também foi eficiente (Fluco 20dpi – $0,40 \times 10^5$ UFC/g \pm 0,42; Fluco 27dpi $0,54 \times 10^5$ UFC/g \pm 0,71). Inesperadamente, não houve diferença entre o grupo infectado e tratado com MPLA mais fluconazol, antifúngico administrado a partir do sétimo dia de tratamento com MPLA (Fluco + MPLA $0,91 \times 10^5$ UFC/g \pm 1,0), em relação aos demais grupos tratados (MPLA, Fluco 20dpi e Fluco 27dpi).

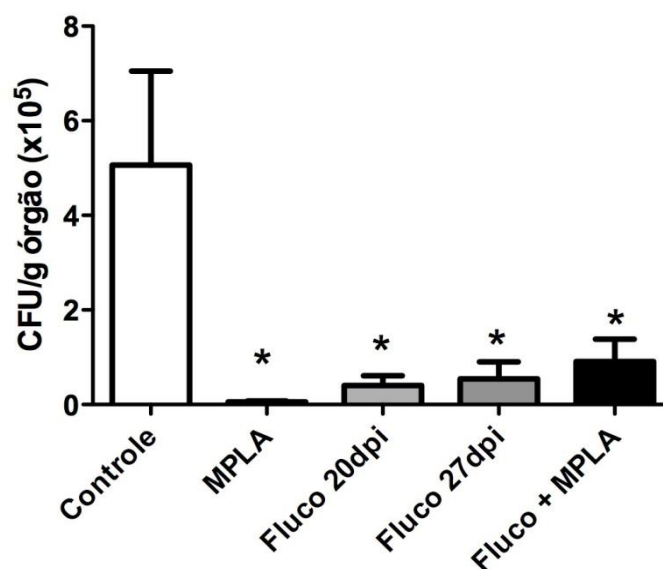


Figura 7. Tratamento com MPLA associado a fluconazol não tem efeito benéfico adicional na redução de carga fúngica no modelo de terapia da PCM experimental, analisado 50 dias após a infecção. Camundongos infectados por via intratraqueal com 3×10^5 leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) foram divididos em grupos que foram injetados 20 dias após a infecção com: **controle** – PBS, **MPLA** – MPLA (20µg/ camundongo), **Fluco 20dpi** – fluconazol (10mg/kg/dia) diariamente até o dia 50 após infecção, e **Fluco+MPLA** – uma dose de MPLA (20µg/ camundongo) e, após 7 dias (27dpi), fluconazol (10mg/kg/dia) diariamente até o dia 50 após infecção. **Fluco 27dpi** – os animais receberam fluconazol (10mg/kg/dia), diariamente, 27 dias pós-infecção. A determinação de carga fúngica foi feita 50 dias após a infecção. Os macerados dos pulmões dos animais foram usados para contagem de UFC. Dados representam a média \pm o desvio padrão dos resultados de cada grupo. Asterisco indicam $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.4. Rastreamento de frações antigênicas que induzem ativação *in vitro* de células esplênicas de animais infectados e tratados com MPLA.

O fato de as preparações AgSom e ExoAg serem capazes de induzir reações de DTH, motivou a avaliação dessas preparações em relação a respostas imunológicas promissoras em animais infectados e tratados com MPLA. Inicialmente, realizou-se a detecção de citocinas de células esplênicas estimuladas com os antígenos por meio da quantificação dos RNAm por RT-PCR em tempo real. Como mostrado na figura 8, há

uma alta expressão de IFN- γ e TNF- α nas células de animais tratados com MPLA estimuladas com AgSom, nas concentrações de 10 e 20 μ g, e com 20 μ g de ExoAg, quando comparadas com as células do mesmo grupo sem estímulo (meio). Ademais, observamos altos níveis de expressão de iNOS nas células de animais tratadas com MPLA e que foram estimuladas com os antígenos nas concentrações anteriormente citadas. A citocina anti-inflamatória TGF- β não teve a detecção dos transcritos tão expressiva quanto outras citocinas. Já IL-10 apresentou níveis de expressão não detectáveis nas células de animais submetidos à terapia com MPLA e estimulada com as diferentes preparações antigênicas. Curiosamente, a expressão dessas citocinas e iNOS apresentou algumas diferenças para os animais infectados e tratados com CFA, chamando atenção os níveis aumentados de IL-10 para células estimuladas AgSom, nas concentrações de 10 e 20 μ g, e com 20 μ g de ExoAg, o que não foi observado para os animais tratados com MPLA.

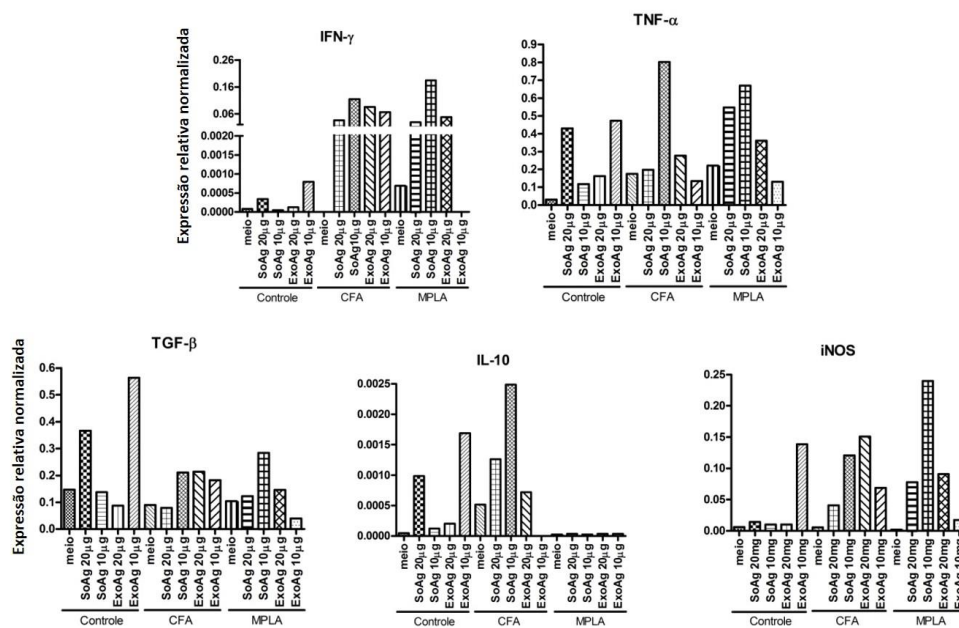


Figura 8. Quantificação da expressão do RNAm de citocinas e da enzima iNOS de células esplênicas por RT-PCR em tempo real. O RNA total de células esplênicas de animais BALB/c infectados com *P. brasiliensis* e tratados com PBS (Controle), CFA ou MPLA foi extraído após 48 horas da estimulação com as preparações antigênicas ExoAg e AgSom em diferentes concentrações (10 e 20 μ g). Após a extração do RNA, o cDNA foi confeccionado para uso na quantificação da expressão relativa. Como controle negativo usou-se o RNA total de células não estimuladas (meio). Para verificar a integridade e qualidade dos cDNAs, foram utilizados pares de iniciadores específicos para β -actina nas reações iniciais. Essas reações de amplificação do gene de β -actina de camundongos também foram utilizadas como normalizadoras das quantidades de cDNA de cada amostra. A expressão relativa do mRNA foi corrigida pela expressão do transcrito do gene constitutivo da β -actina. Células de animais tratados com MPLA estimuladas com

AgSom, nas concentrações de 10 e 20 μ g, e com 20 μ g de ExoAg mostram um perfil pró-inflamatório. Embora CFA também induza perfil parecido, nota-se que esse adjuvante também induz IL-10.

Com o intuito de se identificar antígenos de *P. brasiliensis* que são protetores na terapia com MPLA, separou-se antígenos totais de *P. brasiliensis* em frações menos complexas. Inicialmente, essas frações antigênicas, AgSom e ExoAg, foram resolvidas por eletroforese para padronização das concentrações aplicadas no gel. Em sequência foi feita transferência para a membrana de PVDF (GE Healthcare) (figura 9), sendo recortadas três partes da membrana, referente a antígenos com massa moleculares diferentes. Essas partes da membrana foram usadas para posterior determinação da atividade imunoestimulatória *in vitro* e caracterização de frações proteicas promissoras.

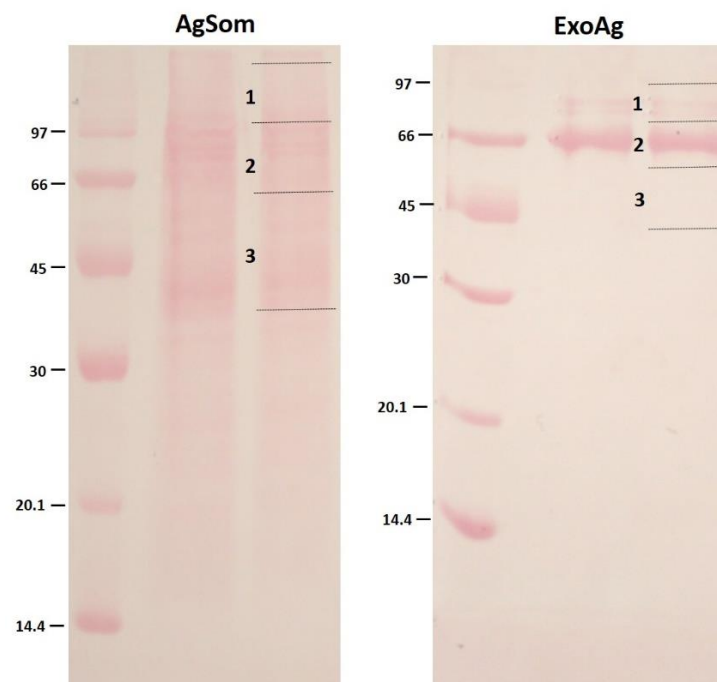


Figura 9. Perfil de proteínas somáticas e extracelulares isoladas do meio de cultura de *P. brasiliensis* transferidas para membrana de PVDF. Antígenos somáticos (**AgSom**) e exoantígenos (**ExoAg**) de leveduras de *P. brasiliensis* foram preparados e separados em SDS-PAGE, conforme descrito na legenda da figura 2. Imediatamente após a corrida eletroforética, as proteínas separadas no gel foram submetidas à transferência para a membrana de PVDF. As membranas foram coradas com Ponceau S e as frações das membranas foram recortadas e 3 partes, como indicado na 3ª raia das duas membranas. Essas frações foram estocadas a -20°C até o uso.

As membranas de PVDF recortadas, contendo antígenos de *P. brasiliensis*, foram adicionadas a placas de cultura de 24 poços, contendo 1mL de meio RPMI completo e

30 μ g/mL de polimixina. A esses poços, foram adicionados macrófagos de linhagem J774, que foram mantidos em cultura durante 24h para fagocitose das frações antigênicas. Após esse período, foram adicionadas células esplênicas dos animais protegidos para determinação dos antígenos que geram resposta proliferativa.

Como pode ser observado na figura 10, quando utilizamos as preparações antigênicas totais, somente AgSom induziu a uma porcentagem significativa de proliferação de linfócitos (13,50% \pm 0,84) quando comparado ao controle (5,86% \pm 0,47). Em relação às membranas de PVDF recortadas contendo antígenos, merece destaque a parte 2 da raia de ExoAg, com proliferação significativa de linfócitos T, marcados com anti-CD3 e anti-Ki67 (32,80% \pm 0,84). Importante mencionar que esta taxa de proliferação ficou muito próxima àquela obtida com o controle positivo (43% \pm 10,54), a lectina ConA, que é forte indutora de mitose em linfócitos T murinos.

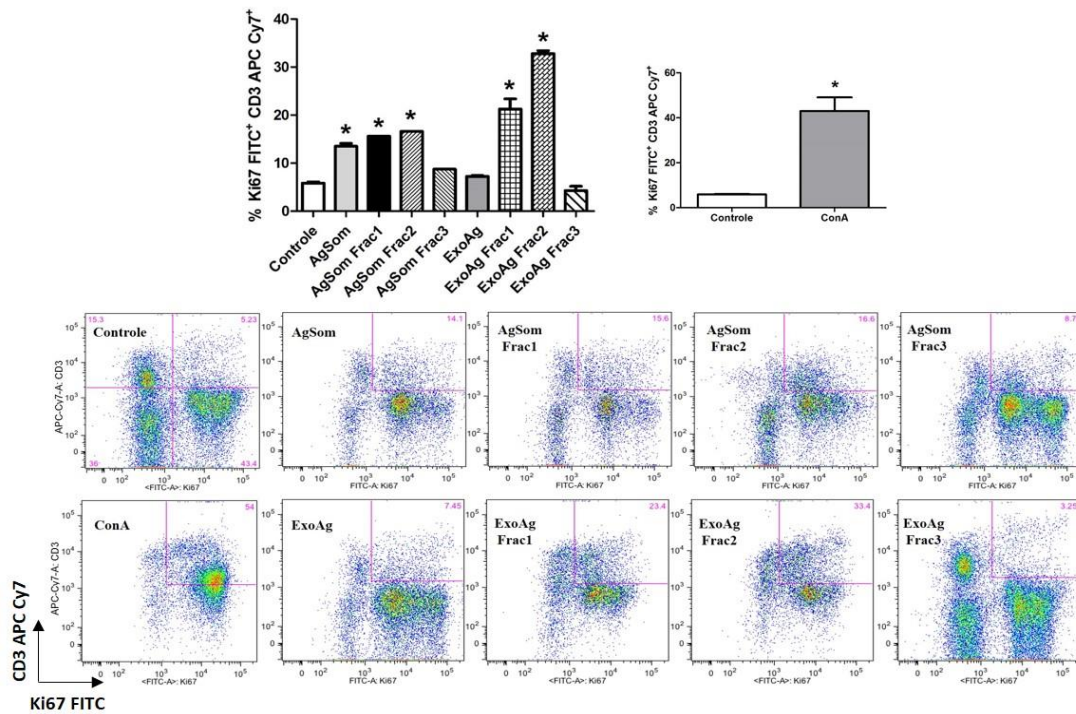


Figura 10. Ensaio de proliferação induzida pelas frações antigênicas de *P. brasiliensis*. As células do baço isoladas de animais infectados e tratados com MPLA, mortos 9 dias após o tratamento, cocultivadas com macrófagos de linhagem J774 previamente estimulados com as frações antigênicas de Pb18, descritas na figura 9 ou ConA (2 μ g/mL), como controle positivo. Células não estimuladas foram usadas como controle negativo (controle). Após 48 horas de cultivo as células foram marcadas com anticorpos contra CD3 APC-Cy7 e Ki67 FITC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por tamanho e granularidade no histograma, dentro da *gate* de linfócitos. O gráfico representa valores da média \pm desvio padrão dos resultados de cada grupo. Asterisco indica $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. Os antígenos de *P. brasiliensis*, principalmente o ExoAg da membrana parte 2, induzem proliferação de linfócitos T esplênicos de animais infectados e tratados com MPLA.

4.5. Sequenciamento da proteína de aproximadamente 60kDa de *P.*

brasiliensis majoritariamente liberada no meio extracelular

Tanto a preparação de AgSom quanto a de ExoAg induziram proliferação de linfócitos T CD3⁺ isolados do baço de animais infectados e tratados com MPLA. Em um primeiro momento, devido a menor complexidade de bandas proteicas resolvidas por eletroforese convencional nas preparações de ExoAg, nesta etapa do estudo, decidiu-se restringir as análises para as frações antigênicas contidas na preparação de ExoAg.

Nas preparações da fração 2 do ExoAg, uma proteína de aproximadamente 60kDa é invariável e majoritariamente expressa na análise por SDS-PAGE quando as leveduras de *P. brasiliensis* são cultivadas em meio *Nutrient Mixture* HAM F-12 (figuras 2, 9 e 11A, indicada pela seta). O fato de essa fração induzir maior porcentagem de proliferação de linfócitos T CD3⁺ isolados do baço de animais infectados e tratados com MPLA e ser majoritariamente expressa na preparação de ExoAg de *P. brasiliensis*, suscitou a hipótese de que essa proteína de 60kDa pudesse um alvo em potencial, o que motivou a sua identificação para clonagem, expressão, avaliação de seu papel terapêutico na PCM experimental.

Para isso, a banda de 60kDa corada com azul de *Coomassie* foi recortada do gel e enviada para a identificação no 'FingerPrints' Proteomics Facility, Post-Genomics and Molecular Interactions Centre, Universidade de Dundee, Dundee, Escócia. A identificação foi realizada através da análise do perfil das massas de peptídeos trípticos (*peptide mass fingerprints*) por espectrometria de massa (1D-LC-MS/MS) e busca por identidade em banco de dados. O resultado do sequenciamento revelou similaridade dessa proteína com diidrolipoil desidrogenase de *P. brasiliensis*. A figura 11B mostra a sequência de aminoácidos de diidrolipoil desidrogenase.



Figura 11. (A) SDS-PAGE da fração ExoAg de *P. brasiliensis*. Leveduras de *P. brasiliensis* foram cultivadas por 15 dias, a 36°C, a 100rpm. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a $10.000 \times g$, e o sobrenadante dialisado em dispositivo Amicon (Millipore) com membrana de exclusão de 3kDa. A banda indicada pela seta foi recortada e enviada para a identificação por espectrometria de massa. Gel corado com azul de Coomassie. **(B) Sequência de aminoácidos da proteína diidrolipoil desidrogenase de *P. brasiliensis*.** Esta proteína possui 514 aminoácidos.

4.6. Clonagem e expressão heteróloga de diidrolipoil desidrogenase de *P. brasiliensis*

3.12.1 Clonagem do gene de diidrolipoil desidrogenase

Primeiramente, foi feita a análise da sequência proteica no site do *Broad Institute* (<https://www.broadinstitute.org/> - PADG_06494.1 *dihydrolipoyl dehydrogenase*). Como essa proteína possui *introns*, foi necessária a extração de RNA de Pb18 para clonagem dos transcritos. Pela análise das bandas em gel de agarose a 1,5%, pode-se observar a integridade e qualidade do RNA de *P. brasiliensis* extraído com o reagente comercial TRIzol® (figura 12A, raias 2, 3, 4 e 5). Essas preparações foram posteriormente dosadas em Nanodrop®, e mostraram uma relação 260/280 de 2,0 e de 260/230 de 2,1.

Após a síntese do cDNA, este foi utilizado como molde para a PCR do gene que codifica diidrolipoil desidrogenase utilizando os pares de iniciadores específicos e enzima DNA polimerase de alta afinidade. A análise dos fragmentos amplificados foi feita em gel de agarose a 0,8% e foi condizente com o tamanho esperado do gene 1.665pb (figura 12B, indicado pela seta). A banda correspondente a esse fragmento foi purificada do gel de agarose e mantida a -20°C até o uso.

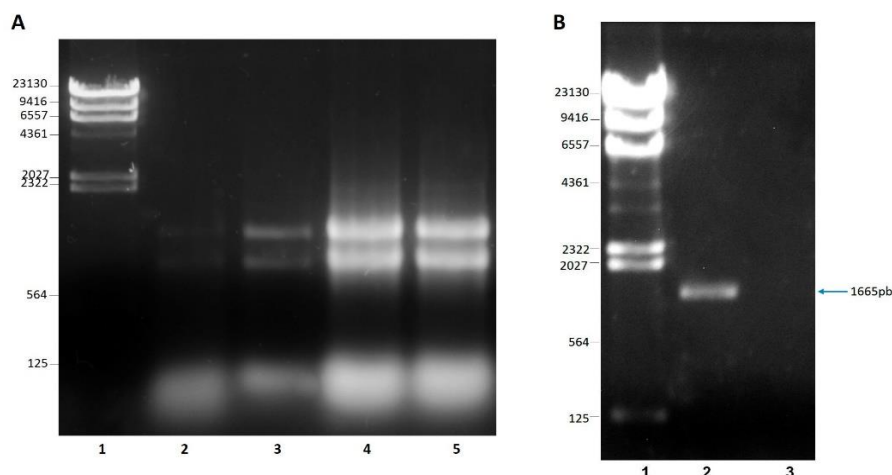


Figura 12. (A) Eletroforese da extração de RNA total de *P. brasiliensis* (Pb18). As células de *P. brasiliensis* foram crescidas por 7, 10, 13 e 15 dias, raias 2, 3, 4 e 5, respectivamente, em meio *Nutrient*

Mixture HAM F-12, a 37°C (forma de leveduras) e recuperadas por centrifugação a $10.000 \times g$. RNA dessas leveduras foram extraídos utilizando-se o reagente comercial TRIzol®. **(B) Amplificação de diidrolipoil desidrogenase.** O cDNA produzido a partir do RNA de *P. brasiliensis* foi submetido a PCR para amplificação de diidrolipoil desidrogenase. A amplificação do produto de PCR de diidrolipoil desidrogenase está mostrado na raia 2 e o controle negativo (sem molde) da reação está representado na raia 3. A análise da qualidade do RNA foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (A) e da amplificação em gel de agarose a 0,8% (B), ambos corados com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Life Technologies). O marcador *DNA λ /HindIII* está mostrado nas raias 1 das figuras A e B, com os tamanhos dos fragmentos de DNA em pb descritos do lado esquerdo da figura.

O inserto purificado foi, então, ligado em vetor de clonagem pCR2.1 TOPO-TA (Life Technologies) e transformado em bactéria *E. coli* da cepa DH10b. Nesta etapa, dez clones foram selecionados e submetidos à PCR para verificação da presença do gene de diidrolipoil desidrogenase. Após confirmação da positividade nos clones selecionados (figura 13A), os plasmídeos foram extraídos e os clones estocados a -80°C. Como a confirmação da clonagem, os plasmídeos purificados foram submetidos à reação de digestão utilizando enzimas de restrição específicas para liberação do inserto, *BamHI* e *NdeI*. Como demonstrado pelas setas na figura 13B, os produtos das reações de restrição apresentaram dois fragmentos: um correspondente ao inserto de 1.665pb (diidrolipoil desidrogenase) e outro, ao vetor de 3900pb (pCR2.1 TOPO-TA), indicando que houve a clonagem do gene no vetor.

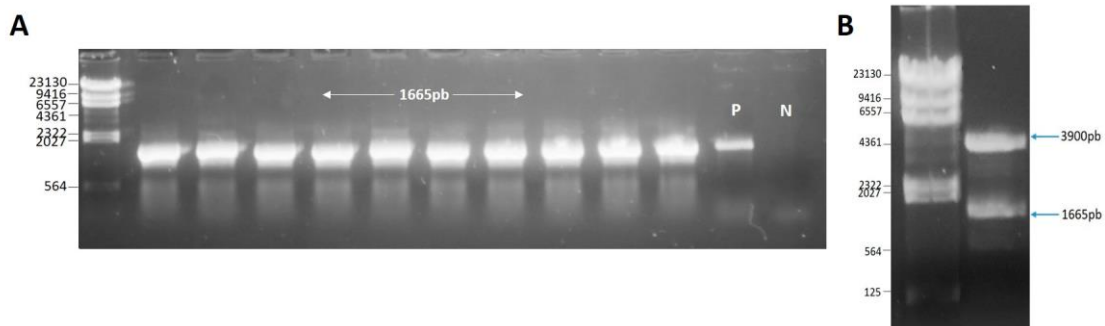


Figura 13. (A) Eletroforese para análise da clonagem do gene de diidrolipoil desidrogenase (*DLD*) no plasmídeo pCR2.1 TOPO-TA. Dez clones de bactérias *E. coli* DH10b contendo o plasmídeo pCR2.1 TOPO-TA/*DLD* foram selecionados de placas com meio seletivo contendo canamicina a 50µg/mL e submetidos à PCR para verificação da amplificação do inserto de diidrolipoil desidrogenase (1665pb). **(B) Eletroforese da digestão de pCR 2.1 TOPO contendo o gene completo de diidrolipoil desidrogenase.** O plasmídeo foi extraído de bactérias *E. coli* DH10b transformadas e submetidos à digestão com enzimas de restrição *BamHI* e *NdeI*. Os produtos da digestão estão indicados pelas setas. As amostras foram submetidas em gel de agarose a 0,8% corado com *SYBR Safe Gel Stain*. O marcador *DNA λ /HindIII* está

mostrado nas raias 1 das figuras A e B, com os tamanhos dos fragmentos de DNA em pb descritos do lado esquerdo da figura. **P** e **N** indicam o controle positivo e negativo da reação, respectivamente.

O inserto liberado enzimaticamente e purificado foi subclonado de um modo sítio dirigido no plasmídeo pET-28a. O produto dessa ligação foi transformado em bactérias *E. coli* DH10b e a presença do gene de diidrolipoil desidrogenase foi confirmada por PCR dos clones selecionados (figura 14A). Plasmídeo pET28a/*DLD* obtido de um clone foi purificado e submetido à reação com enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I, para a liberação do inserto (figura 14B), utilizando a mesma reação descrita para pCR2.1 TOPO-TA/*DLD*. O plasmídeo contendo o gene de diidrolipoil desidrogenase foi enviado para sequenciamento para confirmação da clonagem e verificar se a fase de leitura aberta estava correta.

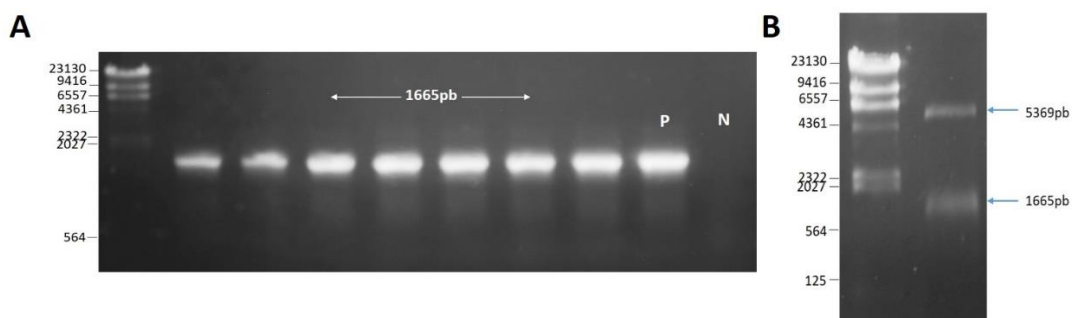


Figura 14. (A) Eletroforese para análise da clonagem do gene de diidrolipoil desidrogenase (*DLD*) no plasmídeo pET-28a. Sete clones de bactérias *E. coli* DH10b contendo o plasmídeo foram selecionados de placas com meio seletivo contendo canamicina a 50µg/mL e submetidos à PCR para verificação da amplificação do inserto de diidrolipoil desidrogenase (1665pb). **(B) Eletroforese da digestão de pET-28a-*DLD*.** O plasmídeo foi extraído de bactérias *E. coli* DH10b transformadas e submetidos à digestão com enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I. Os produtos da digestão estão indicados pelas setas. As amostras foram submetidas em gel de agarose a 0,8% corado com *SYBR Safe Gel Stain*. O marcador *DNA*λ/*Hind*III está mostrado nas raias 1 das figuras A e B, com os tamanhos dos fragmentos de DNA em pb descritos do lado esquerdo da figura. **P** e **N** indicam o controle positivo e negativo da reação, respectivamente.

Uma vez confirmado por análise do sequenciamento de nucleotídeos que as características do pET-28a/*DLD* eram ideais, transformou-se bactérias *E. coli* da linhagem Rosetta com essa construção. A presença do plasmídeo foi confirmada por PCR, como descrito anteriormente (dados não mostrados).

3.12.2 Indução, expressão e purificação de diidrolipoil desidrogenase recombinante

A alta expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* resulta, frequentemente, na produção de agregados insolúveis conhecidos como corpúsculos de inclusão (De Groot e Ventura, 2010). Como observado na figura 15, o rendimento médio da proteína recombinante solúvel foi baixo (representado na figura como fração solúvel – F.S.), nas duas condições de indução com IPTG testadas (0,4 e 0,8mM), devido à expressão, em sua maior parte, como agregados insolúveis (fração insolúvel, F.I.), o que dificultou, inicialmente, o processo de sua produção, assim como sua utilização em análises experimentais. A análise de expressão proteica inicial revelou que a maior produção da proteína recombinante expressa como agregado insolúvel ocorreu, após 6h de indução, com 0,8mM de IPTG.

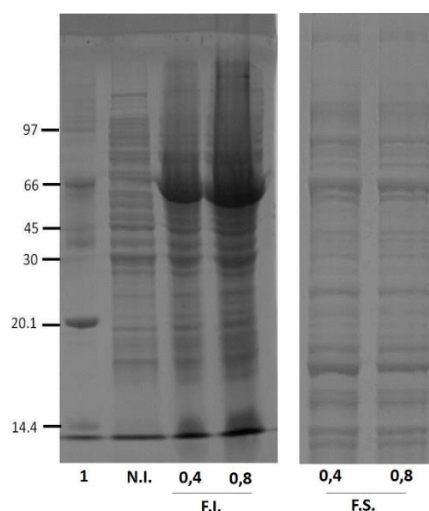


Figura 15. SDS-PAGE de diidrolipoil desidrogenase recombinante expressa como proteína solúvel e corpúsculos de inclusão. Amostras de diidrolipoil desidrogenase expressas em *E. coli* da linhagem *Rosetta* transformadas com pET28a-*DLD* foram coletadas após 6h de indução com diferentes concentrações de IPTG (0,4 ou 0,8mM). Essas amostras foram sonicadas em tampão de lise e centrifugadas a $10.000 \times g$. Sobrenadante (ou fração solúvel – F.S.) e sedimento (ou fração insolúvel – F.I.) foram analisados por SDS-PAGE. Gel corado com azul de Coomassie. A migração eletroforética das proteínas com massa moleculares conhecidas (em kDa) está mostrada na figura (raia 1). N.I. não induzido.

Diante desses resultados, optamos pelo isolamento da proteína recombinante a partir dos corpúsculos de inclusão, solubilizada com ureia (7M), um agente caotrópico desnaturante amplamente utilizado em protocolos de solubilização de proteínas insolúveis (Clark, 2001). A análise eletroforética da proteína purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel imobilizado demonstrou alto grau de homogeneidade, com massa molecular aparente de 60kDa (figura 16). A dosagem proteica pelo método

de Bradford revelou que o rendimento médio de diidrolipoil desidrogenase recombinante solubilizada foi de 10mg de proteína por litro de cultura, sendo obtida uma preparação estoque de 5mg/mL.

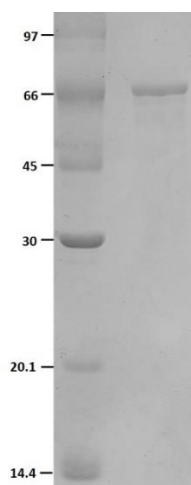


Figura 16. SDS-PAGE de diidrolipoil desidrogenase recombinante solubilizada de corpúsculos de inclusão e purificada por cromatografia de afinidade. Diidrolipoil desidrogenase recombinante expressa como corpúsculos de inclusão foi lavada com solução detergente contendo Triton X-100 a 1% e 2M de ureia, a fim de se eliminar padrões moleculares associados à patógenos presentes em *E. coli*, tais como LPS, lipoproteína, dentre outros. Posteriormente, a proteína foi solubilizada com ureia a 7M e incubada com solução contendo 2mM de L-arginina por 2h, a temperatura ambiente, sob agitação constante, para renaturação proteica. Após centrifugação a $10.000 \times g$, o sobrenadante foi submetido a cromatografia de afinidade em sistema de cromatografia líquida *Akta Purifier* (GE Healthcare) em coluna HiTrap FF Crude (GE Healthcare). A proteína purificada foi analisada por SDS-PAGE a 12%. Gel corado com azul de Coomassie.

4.7. Análise do efeito de diidrolipoil desidrogenase na proliferação de linfócitos esplênicos de animais tratados com MPLA, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos isolados da cavidade peritoneal

A fim de verificarmos se a diidrolipoil desidrogenase recombinante também induzia a proliferação de linfócitos T do baço de animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com MPLA, utilizamos o mesmo protocolo experimental de linfoproliferação do item 4.5. Nesse ensaio, como controle, utilizamos outra proteína recombinante em estudo no laboratório, a gp43. Como pode ser observado na figura 17, diidrolipoil desidrogenase recombinante induz proliferação significativa de linfócitos T ($14,35\% \pm 1,65$) quando comparado ao grupo controle ($5,86\% \pm 0,47$), ao contrário de gp43 recombinante, cuja proliferação ($9,50\% \pm 2,9$) não diferiu significativamente em relação ao controle.

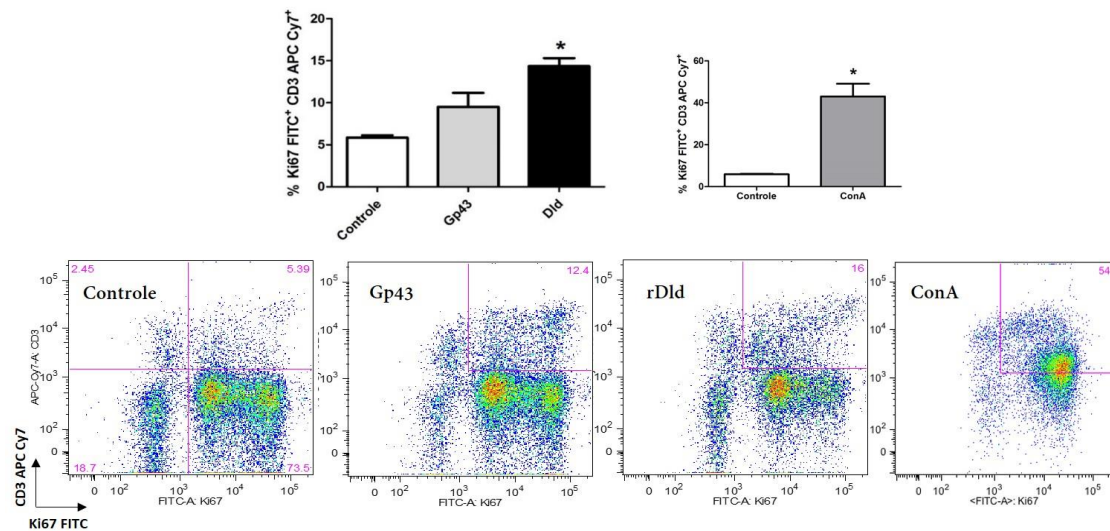


Figura 17. Ensaio de proliferação induzida por proteínas recombinantes de *P. brasiliensis* – diidrolipoil desidrogenase e gp43. Células esplênicas não aderentes (1×10^6) de animais infectados e tratados com MPLA foram cocultivadas com macrófagos de linhagem J774 (3×10^5) previamente estimulados com as frações antigênicas de Pb18 descritas na figura, ou ConA ($2\mu\text{g/mL}$). Células não estimuladas foram usadas como controle negativo (controle). Após 48 horas de cultivo as células foram marcadas com anticorpos contra CD3-APC-Cy7 e Ki67 FITC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por tamanho e granularidade no histograma, dentro da *gate* de linfócitos. O gráfico representa valores da média \pm desvio padrão dos resultados de cada grupo. Asterisco indica $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. Ao contrário de gp43, diidrolipoil desidrogenase recombinante induz proliferação de linfócitos T esplênicos de animais infectados e tratados com MPLA.

Sabendo-se que macrófagos constituem um dos mecanismos primários de defesa contra a infecção por *P. brasiliensis*, avaliamos se diidrolipoil desidrogenase poderia ter algum efeito sob a fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos. Para isso foram utilizados macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c elicitados com tioglicolato, que foram previamente estimulados ou não com a proteína recombinante, e colocados na presença de leveduras do fungo. Interessantemente, após 4h de cocultura, a contagem de UFC dos poços onde os macrófagos foram estimulados com a proteína apresentaram números mais elevados ($6,9 \times 10^3$ UFC/mL \pm 0,10) quando comparados aos poços não estimulados ($3,98 \times 10^3$ UFC/mL \pm 1,28) (figura 18A). Apesar da diferença não ser significativa, nota-se que, no tempo de 24h, há menos fungos recuperados dos macrófagos estimulados com a proteína recombinante ($2,60 \times 10^3$ UFC/mL \pm 0,78) quando comparado aos poços não estimulados ($4,18 \times 10^3$ UFC/mL \pm

0,71) (figura 18B). Assim, sugere-se que a proteína induz um aumento na fagocitose dos macrófagos.

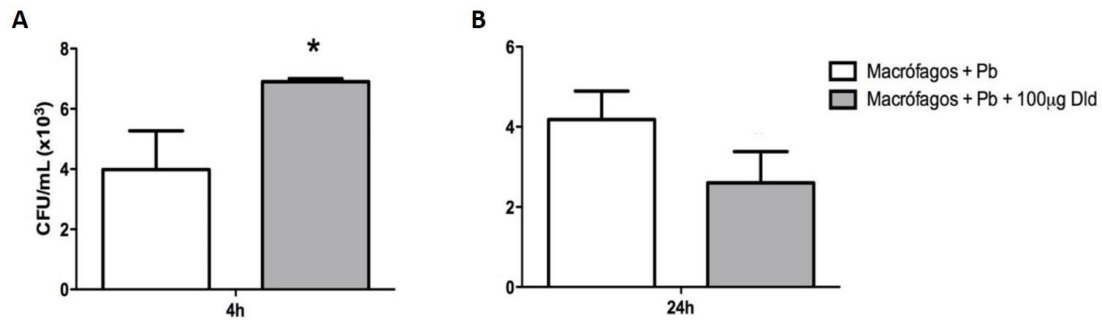


Figura 18. Ensaio de atividade fagocítica e fungicida utilizando macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c tratados com diidrolipoil desidrogenase recombinante. Para a análise de fagocitose, 3×10^5 macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c foram estimulados ou não com $100\mu\text{g}$ de diidrolipoil desidrogenase recombinante e infectados com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis*. Após 4h, todos os poços de cultura de macrófagos foram lavados com RPMI-incompleto. A alguns poços de cultura foi adicionada, posteriormente, água destilada, para lise celular, enquanto a outros restituiu-se o meio de cultura, mantendo-se o cultivo por mais 20h. As células cultivadas por 24h foram lisadas como descrito acima. Cem microlitros do lisado celular foram plaqueados para análise da presença de fungos viáveis pela contagem de UFC. O gráfico representa valores da média \pm desvio padrão dos resultados de cada grupo. Asteriscos indicam $p < 0,05$ em relação aos macrófagos não estimulados.

4.8. Camundongos BALB/c infectados cronicamente com *P. brasiliensis* e tratados com a proteína diidrolipoil desidrogenase tem diminuição na carga fúngica e melhora do quadro inflamatório pulmonar

Com o intuito de investigar se a administração de diidrolipoil desidrogenase recombinante poderia alterar o curso da PCM experimental no modelo de terapia, seguimos o protocolo de tratamento. Surpreendentemente, a administração terapêutica de diidrolipoil desidrogenase recombinante em animais previamente infectados diminuiu significativamente o número de UFC no pulmão desses animais ($0,63 \times 10^5 \text{ UFC/g} \pm 0,41$) em comparação com o controle ($5,06 \times 10^5 \text{ UFC/g} \pm 3,98$). Curiosamente, a administração da proteína associada ao adjuvante não altera significativamente a contagem de UFC (MPLA + Dld – $0,45 \times 10^5 \text{ UFC/g} \pm 0,36$) quando comparado a proteína recombinante administrada sozinha (figura 19A). Paralelamente, foi feito um ensaio utilizando-se a preparação de ExoAg total na terapia dos animais infectados com *P. brasiliensis*, e o efeito de redução da carga fúngica não foi observado (controle – $6,14 \times 10^5 \text{ UFC/g} \pm 3,55$;

ExoAg – $8,02 \times 10^5$ UFC/g \pm 2,78; MPLA + ExoAg $4,98 \times 10^5$ UFC/g \pm 0,80) (figura 19B).

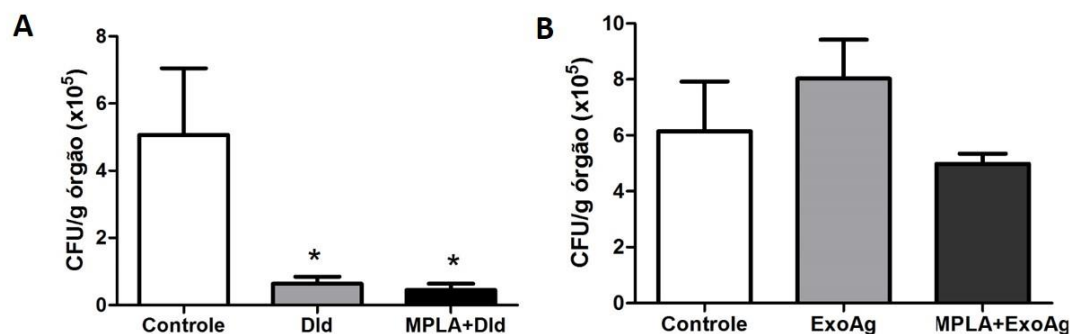


Figura 19. Camundongos infectados pela via intratraqueal com *P. brasiliensis* e tratados com diidrolipoil desidrogenase recombinante tem redução significativa na carga fúngica. Camundongos infectados por via intratraqueal com 3×10^5 leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) foram divididos em três grupos que foram tratados no dia 20 após a infecção com: (A) PBS (**controle**), **Dld** (10 μ g emulsificada em PBS), **MPLA + Dld** (10 μ g de proteína emulsificada em 20 μ g de MPLA), (B) PBS (**controle**), **ExoAg** (20 μ g) ou **MPLA+ExoAg** (20 μ g de ExoAg emulsificado em 20 μ g de MPLA). Os animais foram submetidos à eutanásia após 30 dias dos tratamentos (50 dias após a infecção). Os macerados dos pulmões foram usados para contagem de UFC. Dados representam a média \pm o desvio padrão dos resultados de cada grupo. Asteriscos indicam $p < 0,05$ em relação ao controle.

A análise das lâminas dos pulmões dos animais que receberam os tratamentos com diidrolipoil desidrogenase emulsificada ou não com MPLA mostra que a arquitetura pulmonar estava mais preservada, os granulomas presentes eram compactos e bem organizados. Em contraste e como esperado, numerosos granulomas difusos foram observados no grupo controle (figura 20A). Quando os experimentos foram realizados com ExoAg, ao invés diidrolipoil desidrogenase o comprometimento pulmonar dos animais tratados com a preparação total de ExoAg não difere muito do controle de infecção, mesmo quando essa preparação foi associada ao adjuvante MPLA (figura 20B).

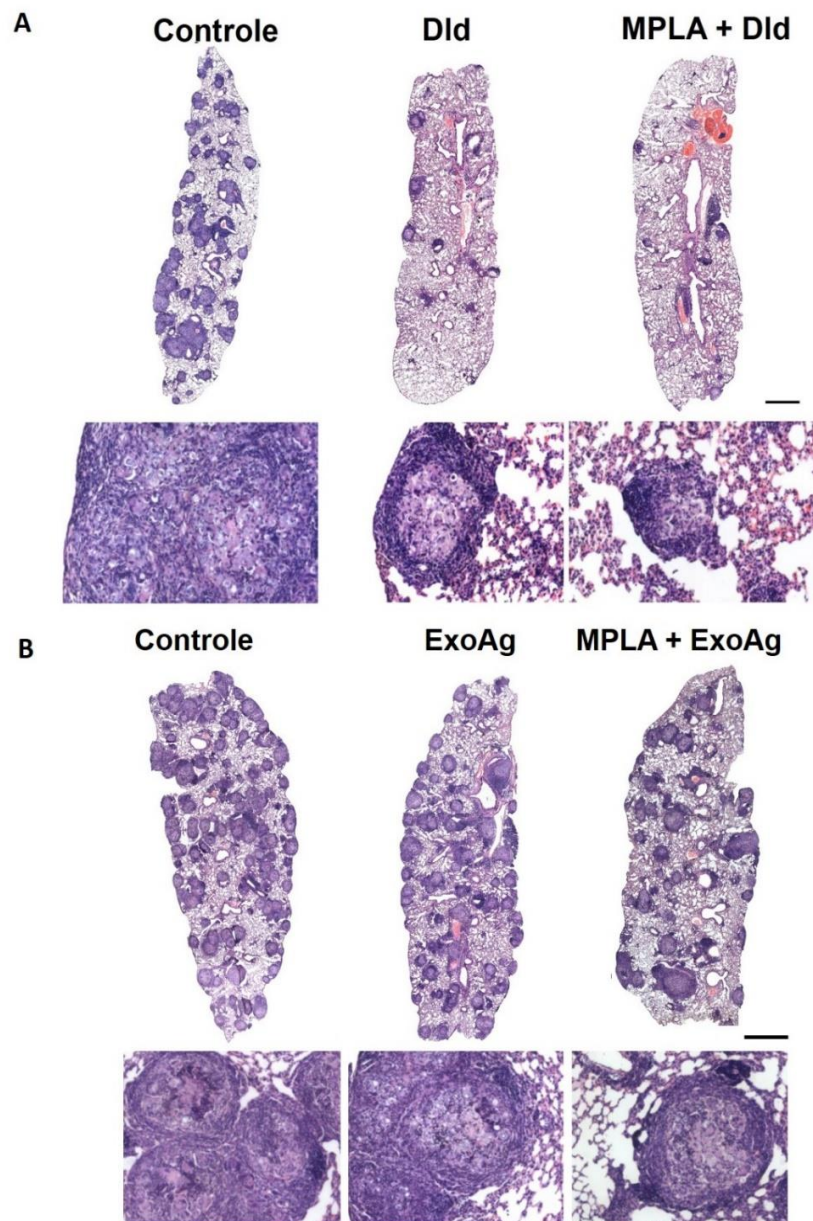


Figura 20. Histologia do pulmão de camundongos BALB/c infectados por via intratraqueal com *P. brasiliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados por via intratraqueal com 3×10^5 leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18). Vinte dias após a infecção, os animais foram tratados conforme descrito na legenda da figura 19A e B. Os animais foram submetidos à eutanásia 30 dias após o tratamento e os pulmões removidos e processados para as análises histológicas. As lâminas foram coradas com HE. As imagens foram capturadas e digitalizadas pelo programa ImagePro. A escala dos cortes está identificada pela linha preta e corresponde a 1mm. As imagens da região inferior da figura são correspondentes à região escolhida aleatoriamente.

Quando se analisou o perfil de citocinas induzidos pelo tratamento com a proteína recombinante e sua associação com o adjuvante, observou-se uma diminuição significativa das citocinas IL-2, IL-6, IL-17, IL-10 e IL-4 (figura 21A, D, E, F e G, respectivamente) para os animais infectados que receberam os tratamentos, tanto com a

diidrolipoil desidrogenase recombinante administrada sozinha quanto associada ao adjuvante, quando comparados ao grupo controle. Já a produção de IFN- γ e TNF- α (figura 21B e C, respectivamente) não foi significativamente diferente do controle.

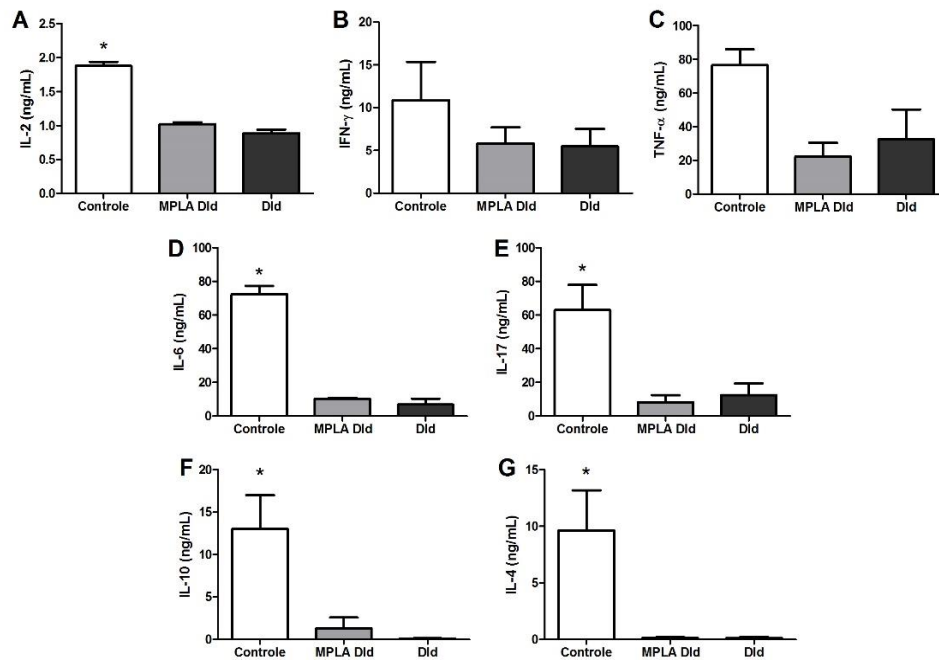


Figura 21. Perfil de citocinas pulmonares de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* e tratados terapêuticamente com diidrolipoil desidrogenase recombinante emulsificada ou não em MPLA. Camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* foram injetados com PBS (**Controle**), 10 μ g de diidrolipoil desidrogenase recombinante emulsificada em 20 μ g de MPLA (**MPLA Did**) ou somente 10 μ g da proteína (**Did**) no dia 20 após a infecção. As citocinas nos macerados pulmonares foram analisadas 30 dias após o tratamento, ou seja, 50 dias após a infecção, a fim de determinar a concentração de (A) IL-2, (B) IFN- γ , (C) TNF- α , (D) IL-6, (E) IL-17, (F) IL-10 e (G) IL-4. As amostras representam a média \pm desvio padrão dos resultados de cada grupo. Asterisco indica $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. Observa-se uma diminuição significativa das citocinas IL-2, IL-6, IL-17, IL-10 e IL-4 para os animais infectados que receberam os tratamentos, tanto a tratados com diidrolipoil desidrogenase recombinante sozinha quanto associada ao adjuvante, quando comparados ao grupo controle. A produção de IFN- γ e TNF- α não foi significativamente diferente do controle.

Em conjunto, esses resultados mostram que a administração terapêutica de diidrolipoil desidrogenase recombinante induz a um efeito benéfico, diminuindo a carga fúngica dos pulmões e os danos pulmonares causados pelo processo inflamatório decorrente da infecção.

4.9. Sublocalização da proteína diidrolipoil desidrogenase e análise da expressão gênica diferencial em células de *P. brasiliensis* nas formas de micélio e levedura

Antissoro contendo anticorpos policlonais contra diidrolipoil desidrogenase recombinante foi produzido em camundongos BALB/c, sendo sua especificidade determinada por *Western blotting*. Quando o antissoro foi incubado com membranas de PVDF que apresentavam diidrolipoil desidrogenase ou proteínas de ExoAg separadas por SDS-PAGE, observou-se o reconhecimento de banda única de massa molecular aparente de 60kDa, em ambas as preparações antigênicas, tamanho este compatível com a proteína diidrolipoil desidrogenase nativa e recombinante (figura 22). Nenhuma banda foi observada na membrana incubada com soro dos camundongos obtidos antes da imunização (figura 22). A ausência de revelação de bandas adicionais, além da de 60kDa, na membrana que apresentavam proteínas de ExoAg pelo antissoro, permitiu sugerir que o antissoro apresentava boa especificidade, sendo adequado para ser usado na localização celular da diidrolipoil desidrogenase em *P. brasiliensis* por imunocitoquímica em nível ultraestrutural.

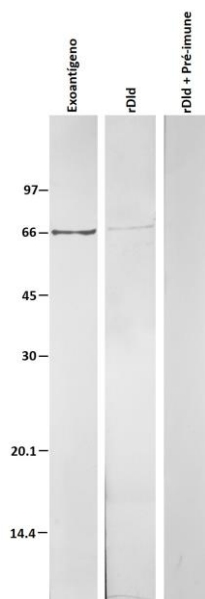


Figura 22. Análise da reatividade do soro policlonal contra diidrolipoil desidrogenase por *Western blotting*. ExoAg e diidrolipoil desidrogenase recombinante foram separados por SDS-PAGE e transferidos para a membrana de PVDF. As membranas contendo diidrolipoil desidrogenase foram incubadas com soro pré-imunização (**pré-imune**) ou soro contendo anticorpos policlonais anti diidrolipoil desidrogenase, diluídos 1:1.000 em solução de 1% de gelatina em TBS-T e com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, diluído 1:5.000 no mesmo tampão. Reação com o antissoro contra diidrolipoil desidrogenase também foi desenvolvida com membranas contendo **ExoAg**. As reações foram reveladas com o substrato peróxido de hidrogênio e revelador DAB. A migração eletroforética com marcador molecular de massa

conhecida está indicada a esquerda na figura. Observa-se o reconhecimento de banda única de massa molecular aparente de 60kDa por antissoro contra diidrolipoil desidrogenase, em ambas as preparações antigênicas, tamanho este compatível com a proteína diidrolipoil desidrogenase.

Para a localização subcelular de diidrolipoil desidrogenase, primeiramente, foi feita a análise *in silico* da localização predita da proteína nos diferentes compartimentos celulares. Para isso, utilizamos como ferramenta o servidor TargetP 1.1. A sequência de peptídeos submetida, como mostrado na tabela 2, teve localização predita na mitocôndria. Segundo os parâmetros da análise, quanto menor o valor de confiabilidade da predição (RC - *reability class*), maior a chance da predição estar correta. Neste caso, o valor foi 1 (os valores variam de 1 a 5).

Tabela 2. Resultados da predição de localização proteica utilizando a ferramenta TargetP v1.1

```
### targetp v1.1 prediction results #####
Number of query sequences: 1
Cleavage site predictions not included.
Using NON-PLANT networks.
```

Name	Len	mTP	SP	other	Loc	RC
Sequence	514	0.972	0.004	0.100	M	1
cutoff		0.000	0.000	0.000		

mTP – peptídeo sinal para mitocôndria (*mitochondrial target peptide*)

SP – Via secretora (*secretory pathway*)

Loc - Localização

M – Mitocôndria

RC – Confiabilidade da predição (*reability class*)

Na análise da localização subcelular de diidrolipoil desidrogenase por microscopia eletrônica, observou-se que há distribuição de numerosas partículas de ouro difusas pelo citoplasma e mitocôndrias (figura 23 – indicada pela seta), tanto em hifa, quanto em leveduras de *P. brasiliensis*. Cabe ressaltar a deposição de partículas de ouro localizadas na parede de hifa. As amostras controle foram obtidas pela incubação das amostras com soro de camundongos pré-imunização.

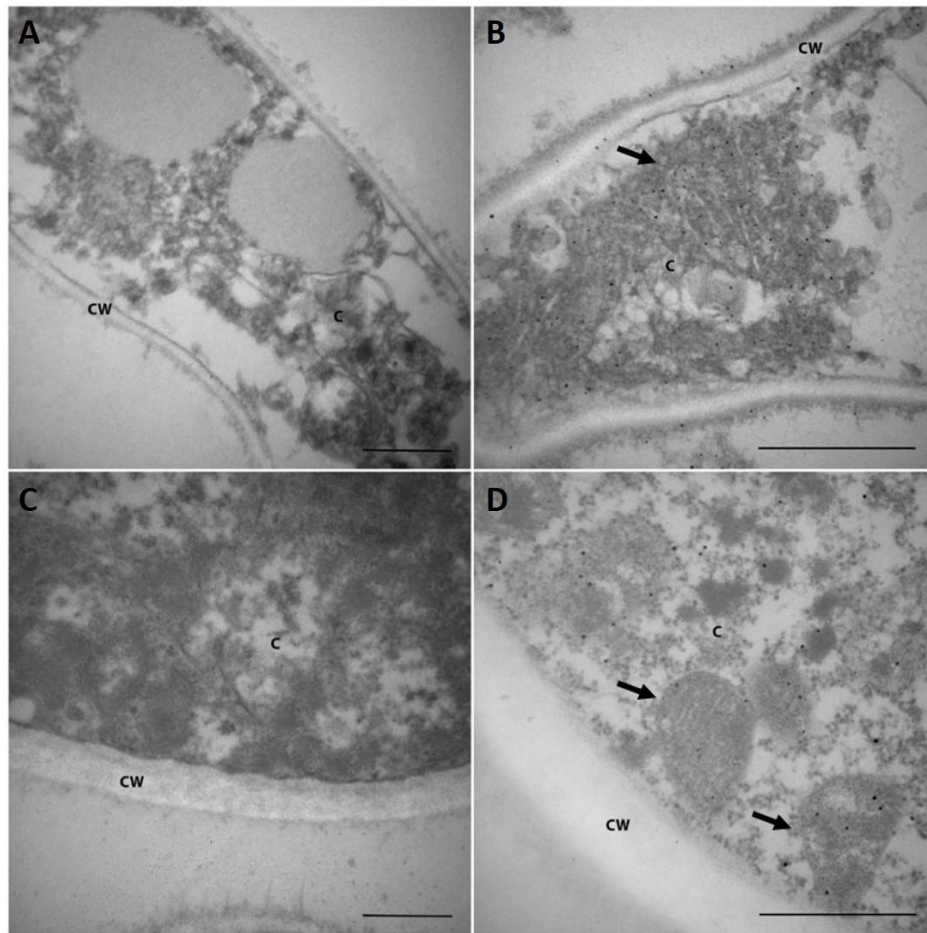


Figura 23. Microscopia eletrônica para verificação da localização de diidrolipoil desidrogenase de hifa e levedura de *P. brasiliensis*. C - Citoplasma, CW - parede celular. As setas indicam as mitocôndrias. A e C – indicam hifas e leveduras, respectivamente, incubadas com o soro de camundongos pré-imunização. B-D, indicam hifas e leveduras, respectivamente, incubadas com o anticorpo policlonal contra a diidrolipoil desidrogenase recombinante. A escala dos cortes está identificada pela linha preta e corresponde a 2 (A-B) e 4 μm (B-D)

Além da localização subcelular da proteína em estudo, avaliamos sua expressão diferencial, a nível transcricional, nas formas de hifa e leveduras, e nas transições morfológicas de hifa para levedura, ou o contrário. Para isso, o RNA total de *P. brasiliensis* nessas respectivas morfologias foi extraído, e a expressão de diidrolipoil desidrogenase foi avaliada por RT-PCR em tempo real. Como controle da integridade das amostras foram utilizados iniciadores específicos para β -actina e β -tubulina de *P. brasiliensis*. Essas reações de amplificação controle também foram utilizadas como normalizadoras das quantidades de cDNA de cada amostra. Uma alíquota do cultivo de cada morfologia fúngica foi corada com *Calcofluor white* para análise por microscopia.

Como observado na figura 24, mensagens para a diidrolipoil desidrogenase foram mais expressas quando o fungo estava na sua forma infectante, levedura (figura 24A),

com diminuição nas fases de transição e baixa expressão na forma miceliana. A análise das imagens de *P. brasiliensis* marcados com Calcofluor confirmam as diferentes morfologias das quais o RNA total foi extraído (figura 24B).

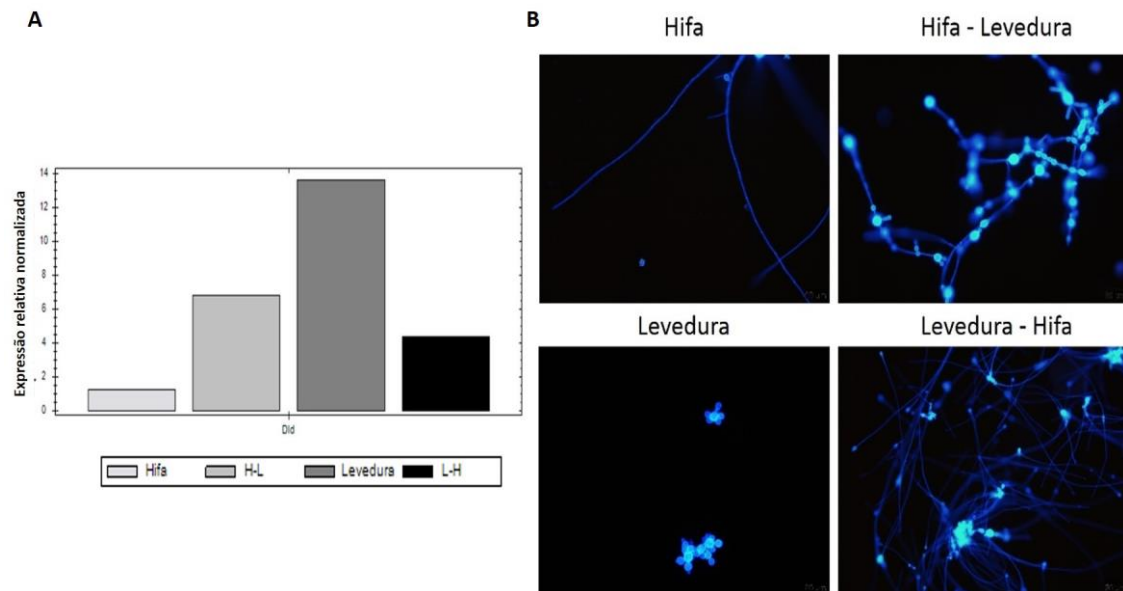


Figura 24. (A) Análise da expressão diferencial de RNAm de diidrolipoil desidrogenase nas formas de hifa e levedura e nas transições de *P. brasiliensis*. O RNA total de *P. brasiliensis* cultivado nas diversas formas indicadas na figura foi extraído e, a partir dele, sintetizado cDNAs, que foram usados para quantificação da expressão relativa do gene de diidrolipoil desidrogenase por PCR em tempo real. Expressão relativa normalizada refere-se à comparação dos transcritos de diidrolipoil desidrogenase com os transcritos dos genes de referência β -tubulina e β -actina de *P. brasiliensis*. **(B) Análise das morfologias por microscopia.** Uma alíquota de cada cultura fúngica anteriormente descrita, imediatamente antes da extração do RNA foi incubada com solução de *Calcofluor White Stain* a $10\mu\text{g/mL}$ por 30 minutos, para marcação das células fúngicas. As imagens foram analisadas a 395/420nm em microscópio de fluorescência, com aumento de 20.000 \times .

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo, demonstramos que o tratamento com uma simples dose de MPLA, um adjuvante liberado para uso em seres humanos e indutor de padrão de resposta imunológica do tipo Th1 – protetora na PCM, foi eficaz em modificar a resposta imunológica de camundongos cronicamente infectados com a cepa 18 de *P. brasiliensis*, levando a (1) uma redução significativa da carga fúngica, (2) uma expressiva diminuição no número de granulomas e células fúngicas no tecido pulmonar e (3) uma resposta imunológica protetora (Th1), quando comparado aos animais infectados e injetados apenas com o veículo. Quando células esplênicas desses camundongos infectados e tratados com MPLA foram estimuladas com frações proteicas da preparação de ExoAg de *P. brasiliensis*, evidenciou-se que uma das frações, cuja a proteína altamente majoritária foi identificada como diidrolipoil desidrogenase, estimulou uma alta porcentagem de proliferação de linfócitos T CD3⁺. Esses resultados motivaram a produção de diidrolipoil desidrogenase recombinante, que foi usada como terapia em camundongos infectados cronicamente com *P. brasiliensis*, resultando em uma redução significativa na carga fúngica pulmonar e lesões inflamatórias, mesmo na ausência de adjuvantes, quando comparado aos animais infectados e injetados com a preparação total de ExoAg ou com veículo. A diidrolipoil desidrogenase foi localizada nas mitocôndrias e também no citoplasma, quando analisada por microscopia eletrônica de transmissão utilizando-se anticorpos policlonais de camundongos contra essa proteína. Um resultado bastante interessante foi o obtido com a análise da expressão gênica diferencial de diidrolipoil desidrogenase em *P. brasiliensis*, pois essa é significativamente mais expressa nas formas patogênica – leveduras, em comparação as formas infectantes – hifas, tendo expressão intermediária nas formas de transição levedura-hifa e hifa-levedura, o que sugere sua importância para a sobrevivência do fungo no hospedeiro.

Resultados prévios de nosso grupo demonstraram que CFA, um potente adjuvante indutor de resposta do padrão Th1, tem potencial imunoterapêutico na PCM experimental, levando a uma diminuição acentuada da carga fúngica e melhora do quadro inflamatório (De Oliveira *et al.*, 2008). Como CFA não é licenciado para uso em humanos devido sua toxicidade (O'hagan, 2001), neste trabalho, aventamos a hipótese que adjuvantes licenciados ou em fase de teste em seres humanos poderiam apresentar um efeito similar ao do CFA. Assim, fizemos experimentos com MPLA, PAM₃CSK₄, AS04 e hidróxido de alumínio. Este último adjuvante foi escolhido porque é o adjuvante mais

frequentemente utilizado em vacinas humanas, embora estimule uma resposta imunológica mediada por Th2 (Marrack *et al.*, 2009; Awate *et al.*, 2013), que não induz proteção em PCM. Já PAM₃CSK₄, um agonista de TLR2, poderia mimetizar o efeito benéfico obtido por uma lectina, ArtinM, que se liga preferencial TLR2 (Coltri *et al.*, 2008). MPLA, um agonista de TLR4, foi escolhido por ser um adjuvante que induz forte resposta Th1 (Coffman *et al.*, 2010). AS04 foi usado porque é uma combinação de MPLA (neste caso de *B. pertussis* e não de *S. minnesota*) e hidróxido de alumínio, que como acima mencionado é um indutor de Th2. Dos adjuvantes analisados, somente MPLA foi eficaz na redução da carga fúngica de animais infectados com *P. brasiliensis*. Este adjuvante mantém suas propriedades imunoestimulatórias *in vitro* e *in vivo* sem apresentar toxicidade (Thompson *et al.*, 2005; Toussi e Massari, 2014).

O uso de MPLA no curso da PCM, de um modo similar aos resultados obtidos com animais infectados e tratados com CFA (De Oliveira *et al.*, 2008), controlou o crescimento fúngico e desenvolveu poucas lesões pulmonares, sendo estas representadas por granulomas bem delimitados e compactos, permitindo inferir que esse tratamento pode ser benéfico no curso da PCM. A estrutura do granuloma tem sido diretamente associada com a progressão da PCM. Evidências parecem indicar que o granuloma de *P. brasiliensis* está intimamente relacionado à resposta imunológica do hospedeiro. Nesse contexto, a formação desses granulomas pode representar uma resposta imunológica tecido-específica do hospedeiro contra o fungo na tentativa de destruir e limitar o patógeno, prevenindo sua multiplicação (Fortes *et al.*, 2011).

Tomados em conjunto, os nossos resultados sugerem que a proteção conferida por administração de MPLA possa estar associada com um aumento na concentração das citocinas pulmonares pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α e diminuição dos níveis de citocinas anti-inflamatórias de IL-4 e IL-10, que provavelmente alterou a resposta imunitária insuficiente resultando no controle da infecção fúngica em camundongos infectados. Sabe-se que as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-12 são relacionadas à proteção da doença, enquanto as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e TGF- β permanecem nas formas graves da doença (Kashino *et al.*, 2000; Benard *et al.*, 2001; Mamoni e Blotta, 2005). IFN- γ tem um importante papel na resistência a *P. brasiliensis* promovendo um aumento no *clearance* de células fúngicas por macrófagos por induzir um aumento na expressão mediadores inflamatórios e de altos níveis da enzima iNOS, responsável pela geração de NO a partir de L-arginina (Cano *et al.*, 1998; Calich *et al.*, 2008). Na PCM, estudos *in vitro* e *in vivo* tem mostrado que NO parece ser um fator importante para morte

das formas filamentosas e de leveduras de *P. brasiliensis* (Gonzalez *et al.*, 2000; Nascimento *et al.*, 2002). IFN- γ induz, ainda, a secreção de TNF- α por macrófagos infectados por *P. brasiliensis*. TNF- α , é uma citocina do padrão Th1 que tem um papel importante para o controle da disseminação e crescimento fúngico e regulação das respostas inflamatórias na PCM. De fato, diferentes trabalhos vêm mostrando o papel de suma importância dessa citocina na formação da reação inflamatória granulomatosa sendo responsável por atrair e ativar células efetoras bem como promover a acumulação de macrófagos e sua diferenciação (Bean *et al.*, 1999; Souto *et al.*, 2000; Phillips e Weinblatt, 2005). Em contraste, a IL-10 é considerada um mediador que facilita a infecção (Ferreira *et al.*, 2007) e tem um efeito supressor nas respostas imunológicas inatas e adaptativas (Costa *et al.*, 2013), embora também seja capaz de prevenir os efeitos imunopatogênicos de resposta imunológica do tipo Th1 (Cyktor e Turner, 2011). A indução de resposta Th1 e secreção de mediadores pró-inflamatórios por MPLA em formulações de vacinas tem sido demonstrada em outros modelos, como infecção por *Leishmania donovani* (Chakravarty *et al.*, 2011).

Interessantemente, os grupos que receberam CFA ou MPLA mostraram níveis de IL-17 semelhantes aos do grupo controle. Alguns trabalhos associam a IL-17 e o importante papel na formação do granuloma, isso tem sido visto para *Mycobacterium tuberculosis* (Okamoto Yoshida *et al.*, 2010). Alguns trabalhos vêm correlacionando a estimulação de TLR4 com a produção de IL-17 na PCM. Loures *et al.* (2010), por exemplo, demonstraram que camundongos deficientes de TLR4 (TLR4^{-/-}) desenvolvem uma resposta imunológica deficiente associada a uma diminuição da expansão de linfócitos Th17 e elevada diferenciação de células Tregs. Em 2015, o mesmo grupo descreveu a ação sinérgica de dectina-1, TLR4 e receptor de manose na indução da proliferação e diferenciação de Th17 mediada por células dendríticas ativadas por *P. brasiliensis* (Loures *et al.*, 2015).

Sabe-se que o tratamento das formas moderadas e graves de PCM consiste em dois passos: a) uma fase de indução para controlar os sintomas clínicos, que geralmente baseia-se no uso de drogas mais ativas e, eventualmente, mais tóxicas; e b) uma fase de manutenção, cuja interrupção baseia-se em testes laboratoriais (Shikanai-Yasuda, 2015). Com base nessa informação, propomos o uso de MPLA como terapia adjuvante do tratamento com drogas antifúngicas convencionais, sendo que neste estudo utilizamos fluconazol, com a dosagem descrita em Marques *et al.* (2006), beneficiando-se de respostas imunológicas do próprio hospedeiro, na fase de indução. Trabalho de Naranjo

et al. (2011) utilizou pentoxifilina, com propriedades imunomodulatórias e anti-fibróticas, como tratamento complementar na PCM, combinando-a ao antifúngico itraconazol. Neste trabalho os autores discutem que, quando a PCM pulmonar evoluiu e atingiu um estágio avançado da doença antes do início do tratamento (como normalmente ocorre em muitos pacientes humanos quando diagnosticada pela primeira vez), a terapia combinada (itraconazol mais pentoxifilina) resultou em uma redução da inflamação granulomatosa e fibrose pulmonar significativamente mais rápida, quando comparados com os resultados da terapêutica antifúngica clássica utilizando itraconazol sozinho. Nossos resultados não mostraram diferenças na contagem de fungos viáveis recuperados do pulmão entre os diferentes grupos, o que nos fez sugerir que o tempo de administração do fluconazol foi determinante para o insucesso. Em nosso trabalho, administramos a medicação diariamente durante três semanas após o desafio com MPLA, o que foi diferente do trabalho de Naranjo *et al.* (2011). Nesse, a terapia medicamentosa iniciou-se com quatro ou oito semanas após a infecção e a administração foi feita diariamente, durante oito semanas, quando praticamente o número de fungos viáveis, marcados por coloração de Grocott, foi significativamente menor em comparação com o grupo que recebeu somente itraconazol.

Ao contrário do MPLA, PAM₃CSK₄, AS04 e alúmen não propiciaram uma melhora nos animais infectados, o que foi manifesto por altas cargas fúngicas e lesões inflamatórias muito similares ao controle tratado apenas com veículo. Embora alúmen possa estimular resposta inflamatória em uma via independente de TLR em macrófagos, já que alguns autores observaram que alúmen pode ativar *in vitro* Nlrp3, um componente do inflamassomo, isoladamente esse adjuvante parece não ser capaz de induzir a transcrição dos genes de IL-1 β e IL-18, o que tem gerado certa controvérsia na literatura (Marrack *et al.*, 2009). Assim, a inflamação gerada pelo adjuvante parece não contribuir para a melhora dos animais, ainda mais que alguns relatos o descrevem como indutor de resposta imunológica não protetora contra PCM, qual seja um perfil de citocinas do padrão Th2 (Awate *et al.*, 2013). Quanto ao AS04, a partir dos resultados obtidos, sugere-se que o alúmen possa ter revertido a proteção de MPLA, já que esse MPLA de *B. pertussis* foi testado isoladamente e gerou melhora do quadro infeccioso, de um modo similar ao efeito do MPLA de *S. minnesota* (dados não mostrados). Tendo em vista as dificuldades de se comparar dois modelos de infecção cuja proteção dependam de efetuação de respostas imunológicas diferentes, não podemos deixar de contrastar nossa possível explicação com as conclusões obtidas por Didierlaurent *et al.* (2009). Esses

autores estudaram o mecanismo de ação de AS04, utilizando a vacina contra HPV, que é formulada com esse adjuvante em células humanas *in vitro* ou *in vivo* em modelo murino após injeção intramuscular, e sugeriram que o alumínio não tem ação sinérgica ou inibitória sobre a ação de MPLA, e prolonga a resposta de citocinas no local da injeção. Apesar de não terem feito ensaio de proteção e ser um outro modelo de infecção, as conclusões de Didierlaurent *et al.* (2009) devem ser levadas em consideração, o que nos faz sugerir que mais do que a presença do alumínio, possivelmente, a dose de MPLA da formulação AS04 (5µg) usada para o tratamento não foi suficiente para a indução de respostas no protocolo terapêutico da PCM.

A falha de PAM₃CSK₄ em proteger animais infectados pode também ser creditada a um perfil de resposta mais Th2, já que alguns estudos demonstram que o adjuvante estimula TLR2/TLR1 e induz, preferencialmente, esse padrão de resposta (Dillon *et al.*, 2004; Toussi e Massari, 2014). De fato, Carrera *et al.* (2010) demonstraram que a administração de PAM₃CSK₄ anteriormente à infecção por *Trypanosoma cruzi*, atenuou a resposta inflamatória exacerbada em fígados de camundongos, em parte, atribuída a diminuição da produção de citocinas inflamatórias e aumento de TGF-β nos leucócitos hepáticos. O assunto ainda é controverso, haja vista que alguns trabalhos demonstram que a administração de PAM₃CSK₄ associado a *Leishmania major* reduz a patologia em camundongos resistentes e suscetíveis pela indução de citocinas pró-inflamatórias, do padrão Th1 e Th17 (Huang *et al.*, 2015). Para *P. brasiliensis*, Ferreira *et al.* (2007), ao caracterizarem o perfil de células dendríticas pulmonares na interação com este fungo, observaram um aumento na expressão de TLR2 e produção de IL-10 em animais suscetíveis, sugerindo que células dendríticas com perfil regulatório possam ser induzidas pela sinalização de TLR2 e dectina-1. Loures *et al.* (2009), ao avaliar a sinalização via TLR2 durante a infecção por *P. brasiliensis*, discutem que esse receptor facilita a infecção e tem um efeito inibitório no desenvolvimento de reações inflamatórias, principalmente associada com Th17. Em nosso modelo, a administração de PAM₃CSK₄ não alterou de forma benéfica o curso da PCM experimental.

Quando obtivemos os resultados de carga fúngica e análise histopatológica de todos os adjuvantes e observamos que apenas MPLA induzia uma melhora do processo inflamatório, focamos nesse adjuvante, excluindo PAM₃CSK₄, AS04 e alumínio dos ensaios posteriores. Dessa forma, a alusiva indução de resposta Th2 ou ausência de direcionamento de resposta imunológica por PAM₃CSK₄, AS04 ou alumínio é

especulativa, já que seriam necessários experimentos para determinação de padrão de resposta imunológica em cada caso.

O fato de animais infectados cronicamente com *P. brasiliensis* ter uma expressiva melhora no quadro inflamatório e diminuição de carga fúngica com apenas uma dose de MPLA, na ausência de antígenos fúngicos nesta preparação terapêutica, implica que se o efeito foi resultante de estimulação do sistema imunológico, provavelmente, houve uma mudança de resposta a antígenos secretados (ExoAg) *in vivo* pelos fungos e/ou liberados pela morte destes (AgSom) durante o curso da infecção. Passamos, então, a procurar um antígeno, que associado a tal adjuvante, pudesse conferir proteção de longa duração aos animais infectados cronicamente com *P. brasiliensis*. Quando estimulamos células esplênicas de animais infectados e tratados com MPLA com preparações de ExoAg ou de AgSom, observamos que ambas induziam a proliferação de linfócitos T CD3⁺. Devido a menor complexidade antigênica observada em nossas preparações de ExoAg, testamos antígenos dessa preparação, adsorvidos em membranas de PVDF após separação em SDS-PAGE, e observamos que a fração 2 apresentava maior atividade proliferativa sobre linfócitos T CD3⁺. A análise eletroforética revelou que esse material continha uma proteína majoritária de 60kDa, e embora não fosse observada outras bandas, é conhecido que essa faixa de massa molecular abriga grande quantidade de proteínas, podendo a banda ser composta de mais de uma proteína. Para a identificação da(s) proteína(s) de 60kDa, submetemos a banda à digestão *in situ* com tripsina, seguindo de análise dos digestos por espectrometria de massa. Apenas a proteína diidrolipoil desidrogenase foi identificada, sugerindo que sua expressão está aumentada no sobrenadante de cultura líquida usando-se meio sintético, quando comparada ao meio complexo NGTA (Priscila C. Corrêa, comunicação pessoal).

Os resultados de estimulação de células T com ExoAg, particularmente, a fração contendo diidrolipoil desidrogenase foram muito interessantes dada a importância que preparações fúngicas extracelulares adquirem por fazerem o primeiro contato com as células do hospedeiro (Franco *et al.*, 1993). O fato de diidrolipoil desidrogenase ser isolada de sobrenadante sugere que seja um ExoAg liberado pelo fungo, um achado intrigante, pois essa proteína é típica de mitocôndria. Ela faz parte da maquinaria responsável pela respiração aeróbia, já que o piruvato produzido pela glicólise e pela via das pentoses fosfato é principalmente oxidado e descarboxilado a acetil-CoA pelo complexo da piruvato desidrogenase, do qual faz parte a diidrolipoil desidrogenase (Nelson *et al.*, 2005). Embora inúmeras proteínas ou glicoproteínas, com massas

moleculares que variam de 17 a 190kDa, sejam secretadas em cultura por *P. brasiliensis*, sendo reconhecidas, em grau variável pelo soro de pacientes (Panunto-Castelo *et al.*, 2003), não há descrição do isolamento de tal enzima no sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis*. Para *P. lutzii*, trabalho publicado por Weber *et al* (2012) (Weber *et al.*, 2012) demonstrou que diidrolipoil desidrogenase está entre os constituintes da proteômica extracelular das formas de hifa e levedura do fungo. Esse trabalho ainda corrobora os nossos resultados quando analisa a ausência de peptídeos sinal na sequência da proteína (análise *in silico* não mostrada), sugerindo que a mesma tem um mecanismo de secreção por uma via não clássica. Um exemplo desse tipo de transporte são as vesículas extracelulares produzidas por fungos, cuja liberação em fungos foi demonstrada pela primeira vez em 2007 para *Cryptococcus neoformans* (Rodrigues *et al.*, 2007). Em *Paracoccidioides spp.*, foram identificadas, entre os constituintes dessas vesículas, algumas enzimas envolvidas na via glicolítica e ciclo do ácido tricarboxílico, como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, enolase, triose fosfato isomerase e frutose-1-6-bisfosfato aldolase, microscopicamente localizadas na parede celular e implicadas em adesão a componentes da matriz extracelular. A capacidade de realizar funções biológicas não relacionadas à função canônica atribuída a proteína é comum para algumas enzimas envolvidas no metabolismo de *Paracoccidioides spp.*, e, não raramente, estão envolvidas na virulência (Marcos *et al.*, 2014).

Os carboidratos são a fonte primária e preferencial de carbono para a maioria dos organismos, sendo utilizados para gerar energia e produzir biomoléculas (Askew *et al.*, 2009). Uma das principais características adaptativas para a sobrevivência de patógenos no microambiente hostil do hospedeiro é, além da expressão de fatores de virulência, a capacidade de assimilar várias fontes de carbono para produção de energia. Os macrófagos, por exemplo, formam um microambiente no fagossomo que é pobre em glicose e aminoácidos, tendo pH baixo. Ao se fundir com lisossomos, os fagolisossomos expõe o agente fagocitado à presença de enzimas hidrolíticas, de peptídeos antimicrobianos e de compostos tóxicos (Lorenz *et al.*, 2004; Barelle *et al.*, 2006). Análises das respostas às mudanças encontradas no sítio da infecção fornecem explicações para os mecanismos de sobrevivência exigidos pelos diferentes microrganismos. Assim, alguns estudos apontam que a remodelação metabólica observada em condições de infecção é uma estratégia de sobrevivência. Para *Paracoccidioides spp.*, em diferentes estudos, nos quais o fungo foi cultivado em condições de privação de micronutrientes, as proteínas que se apresentaram

diferencialmente reguladas estão envolvidas em processos celulares que incluem metabolismo, energia, síntese de proteínas, defesa e virulência (Lima *et al.*, 2014). Em *P. lutzii*, quando cultivado em privação de cobre, o complexo piruvato desidrogenase apresentou-se induzido, sugerindo que a disponibilidade de Acetil-CoA gerado pelo piruvato pode ser importante para a sobrevivência de *P. lutzii* em condições inóspitas. Parente *et al.* (2015) mostraram que o fungo pode remodelar seu metabolismo quando sujeito a condições que mimetizam a infecção de macrófagos por *P. brasiliensis*. Discutem a indução das enzimas da degradação de aminoácidos e da gliconeogênese, e sugerem que o fungo possa usar esqueletos de carbono de aminoácidos para sintetizar glicose, possivelmente, a partir do hospedeiro ou possa reciclar as suas próprias moléculas contendo carbono. Nesse trabalho, os autores observaram que durante a infecção de macrófagos por *P. brasiliensis* há um aumento na expressão de diidrolipoil desidrogenase por esse fungo.

Com efeito, os dados da literatura, de forma direta ou indireta, sugerem o papel essencial de diidrolipoil desidrogenase para a biologia de *P. brasiliensis*. A alta expressão de diidrolipoil desidrogenase na preparação de ExoAg de *P. brasiliensis* e o fato de ser fracamente reconhecida por soros de pacientes com a doença ativa (dados não mostrados) suscitou a hipótese de que essa proteína pudesse ser um potencial fator de virulência. Uma abordagem comum para o reconhecimento de fatores de virulência em fungos dimórficos é estabelecer uma correlação entre o aumento da expressão do possível fator na forma patogênica do fungo (Rappleye e Goldman, 2006). Nossas avaliações da expressão gênica diferencial da enzima em diferentes morfologias de *P. brasiliensis*, diidrolipoil desidrogenase teve sua expressão mais evidente na forma de levedura. Estudos futuros, utilizando *P. brasiliensis* geneticamente deficiente de diidrolipoil desidrogenase poderão fornecer dados para correlacioná-la com virulência.

Em nosso estudo, vimos a fração contendo diidrolipoil desidrogenase foi capaz de induzir uma alta porcentagem de proliferação de linfócitos T CD3⁺ isolados de animais tratados com MPLA, porém, não podíamos excluir que outra proteína compusesse a banda e fosse essa a induzir proliferação. Para atribuímos o efeito à diidrolipoil desidrogenase, fizemos, então, a clonagem do gene e a expressão em *E. coli*, para posterior estudo da proteína. Uma desvantagem da produção de proteínas recombinantes em *E. coli* é a contaminação com padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), dentre os quais merece destaque o LPS, o que limita o uso dessas preparações proteicas em culturas celulares que visam avaliar a estimulação de células do sistema imunológico,

bem como em animais. Esse problema foi solucionado tomando-se proveito de uma das características de expressão dessa proteína recombinante neste sistema heterólogo, qual seja, a expressão da proteína, em sua maior parte, ocorreu como agregados insolúveis, conhecidos como corpúsculos de inclusão (Sabate *et al.*, 2010). Assim, com sucessivas lavagens desses corpúsculos com tampão contendo reagentes (Triton a 1% e ureia a 2M) para remoção desses resíduos (Clark, 2001) foi possível eliminar os PAMPs.

Quando adicionamos a proteína diidrolipoil desidrogenase recombinante aos macrófagos elicitados da cavidade peritoneal, a mesma induziu maior fagocitose e não há, até o presente momento, descrição se essa proteína tem algum papel relevante na modulação imunológica do hospedeiro. Isso nos motivou a utilizá-la em nosso protocolo terapêutico na PCM experimental, associando-a ou não à MPLA. Em outros modelos de infecção, como para *M. tuberculosis*, diidrolipoil desidrogenase vem sendo descrita como potencial alvo terapêutico. Heo *et al.* (2011) demonstraram que diidrolipoil desidrogenase recombinante de *M. tuberculosis* induz maturação de células dendríticas e repostas do tipo Th1. De forma surpreendente, a administração da proteína sozinha, sem a presença de adjuvantes, em animais cronicamente infectados, induziu redução do número de fungos recuperados do pulmão dos animais e melhora do quadro histopatológico pulmonar quando comparado ao controle tratado apenas com veículo. Além disso, quando avaliamos o perfil de citocinas induzido pela administração da proteína, observa-se baixa produção das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 e das inflamatórias IL-6 e IL-17, em comparação aos animais que não receberam tratamento. A produção de IFN- γ e TNF- α , ainda que induzidas, não foram significativas em relação ao controle no período avaliado. Sugere-se assim, que a administração da proteína possa modular a resposta por uma cinética de produção de citocinas diferentes daquelas induzidas pelo adjuvante sozinho. Embora não tenhamos feito a detecção de citocinas em tempos menores de estimulação com a proteína, é possível que o pico dessas citocinas ocorram alguns dias após a estimulação, sendo que tal resposta deva estar em declínio no tempo avaliado – 30 dias após o tratamento.

Há, na literatura, poucos estudos que relatam o efeito de antígenos do próprio fungo capazes de induzir uma resposta imunológica celular eficaz e proteção do hospedeiro. De forma semelhante aos nossos resultados, somente a administração do peptídeo P10 de gp43 (Taborda *et al.*, 2015) e paracoccina, uma lectina ligante de N-acetilglicosamina (Alegre-Maller *et al.*, 2014), apresentaram proteção efetiva em formulações que não necessitam de adjuvante. Para paracoccina, é demonstrado que esta

proteína se liga à laminina e induz a produção de TNF- α por macrófagos (Coltri *et al.*, 2006) e que a proteína homóloga recombinante induz a produção de IL-12 por macrófagos murinos, de uma forma dependente da sinalização de TLR2 e TLR4. A ativação celular por paracoccina ocorreu independentemente da heterodimerização de TLR2 com TLR1 e TLR6 e não necessita dos correceptores CD14 ou CD36 (Alegre-Maller *et al.*, 2014). Para a diidrolipoil desidrogenase, novos estudos são necessários para determinação das moléculas e vias de sinalização pelas quais ela induz resposta.

Em síntese, neste estudo, demonstramos a eficácia da administração de MPLA, um adjuvante com fortes propriedades imunoestimulatórias e baixa toxicidade, em animais submetidos ao protocolo terapêutico da PCM experimental. Quando comparado ao grupo controle, os pulmões dos animais tratados com MPLA demonstraram diminuição do crescimento fúngico e redução notável do número e tamanho dos granulomas, com lesões bem definidas. Acreditamos que a quimioterapia em doenças fúngicas pode ser complementada por estratégias de indução de uma resposta imunológica efetiva para o controle duradouro e redução do tempo da terapia medicamentosa. A seleção de um adjuvante com forte perfil de segurança foi baseada no conceito de que efeitos indesejáveis da imunopatologia por estimulação exacerbada são fatores a serem considerados na pesquisa por um tratamento efetivo nos casos graves de PCM. Ademais, isolamos, identificamos e clonamos uma proteína de *P. brasiliensis*, a diidrolipoil desidrogenase, cujos resultados na terapia da PCM experimental foram benéficos, mesmo na ausência de adjuvante. Embora ainda existam alguns pontos que deverão ser esclarecidos, como por exemplo, a geração de células de memória durante o protocolo terapêutico e a ativação de células Tregs, esses resultados abrem perspectivas para o estudo de diidrolipoil desidrogenase como candidata para estudo na terapia da PCM, além de instigar melhores investigações de seu papel na virulência de *P. brasiliensis*.

6. CONCLUSÕES

- MPLA, e não outros adjuvantes testados – PAM3CSK4, AS04 e hidróxido de alumínio, tem efeito terapêutico na PCM experimental, reduzindo de forma significativa a carga fúngica de animais infectados cronicamente por *P. brasiliensis*, levando à melhora do quadro histopatológico indução de um perfil de resposta do tipo Th1,
- A proteína isolada de ExoAg, identificada como diidrolipoil desidrogenase, induz proliferação de linfócitos T CD3⁺ isolados do baço de animais tratados com MPLA,
- A administração terapêutica de diidrolipoil desidrogenase recombinante na PCM experimental é benéfica, mesmo na ausência de adjuvantes,
- A localização subcelular de diidrolipoil desidrogenase, por microscopia eletrônica de transmissão, mostrou que a mesma está localizada na mitocôndria e também no citoplasma,
- A análise da expressão gênica diferencial de diidrolipoil desidrogenase em *P. brasiliensis* mostrou que essa proteína é significativamente mais expressa em leveduras em comparação a hifas e formas de transição.

7. REFERÊNCIAS

- ALEGRE-MALLER, A. C. *et al.* Therapeutic administration of recombinant Paracoccin confers protection against *paracoccidioides brasiliensis* infection: involvement of TLRs. **PLoS Neglec Trop Dis**, v. 8, n. 12, p. e3317, Dec 2014.
- ALEGRE, A. C. *et al.* Recombinant paracoccin reproduces the biological properties of the native protein and induces protective Th1 immunity against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS Neglec Trop Dis**, v. 8, n. 4, p. e2788, Apr 2014.
- ALMEIDA, F. P. Estudos comparativos do granuloma coccidióico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. **An Fac Med São Paulo**, v. 5, p. 125-41, 1930.
- AMATI, L. *et al.* Toll-like receptor signaling mechanisms involved in dendritic cell activation: potential therapeutic control of T cell polarization. **Curr Pharm Des**, v. 12, n. 32, p. 4247-54, 2006.
- ASKEW, C. *et al.* Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 10, p. e1000612, Oct 2009.
- AUTRAN, B. *et al.* Therapeutic vaccines for chronic infections. **Science**, v. 305, n. 5681, p. 205-8, Jul 9 2004.
- AWATE, S.; BABIUK, L. A.; MUTWIRI, G. Mechanisms of action of adjuvants. **Front Immunol**, v. 4, p. 114, 2013
- BAGAGLI, E. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, Apr-May 2008.
- BARELLE, C. J. *et al.* Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 6, p. 961-71, Jun 2006.
- BAZAN, S. B. *et al.* Loss- and Gain-of-Function Approaches Indicate a Dual Role Exerted by Regulatory T Cells in Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglec Trop Dis**, v. 9, n. 10, p. e0004189, 2015.
- BEAN, A. G. *et al.* Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. **J Immunol**, v. 162, n. 6, p. 3504-11, Mar 15 1999.
- BENARD, G. *et al.* Treatment of severe forms of paracoccidioidomycosis: is there a role for corticosteroids? **Med Mycol**, v. 50, n. 6, p. 641-8, Aug 2012
- BENARD, G. *et al.* Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J Infect Dis**, v. 175, n. 5, p. 1263-7, May 1997.

- BENARD, G. *et al.* Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, n. 4, p. 248-52, Feb 21 2001.
- BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **J Leukocyte Biol**, v. 70, n. 6, p. 849-60, Dec 2001.
- BOCCA, A. L. *et al.* Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 1177-91, Sep 2013.
- BOCCA, A. L. *et al.* Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J Immunol**, v. 161, n. 6, p. 3056-63, Sep 15 1998.
- BOCCA, A. L. *et al.* Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, n. 2, p. 280-7, Aug 1999.
- BORGES-WALMSLEY, M. I. *et al.* The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 80-7, Feb 2002.
- BUENO, R. A. *et al.* Antibodies Against Glycolipids Enhance Antifungal Activity of Macrophages and Reduce Fungal Burden After Infection with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Front Microbiol**, v. 7, p. 74, 2016.
- CACERE, C. R. *et al.* The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. **Clin Immunol**, v. 105, n. 2, p. 215-22, Nov 2002.
- CALICH, V. L. *et al.* Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 223-36, Apr-May 2008.
- CALICH, V. L.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 5, p. 615-23, May 1998.
- CALICH, V. L.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, v. 66, n. 3, p. 175-7, Feb 28 1979.
- Calich, V. L., Singer-Vermes, L. M. *et al.* Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J Exp Pathol**, v.66, n.5, p.585-94, 1985.
- CALVI, S. A. *et al.* Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes Infect**, v. 5, n. 2, p. 107-13, Feb 2003.
- CAMARGO, Z. P. *et al.* Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 10, p. 2377-81, Oct 1994.

- CAMPANELLI, A. P. *et al.* Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. **J Infect Dis**, v. 187, n. 9, p. 1496-505, May 1 2003.
- CANO, L. E. *et al.* Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 66, n. 2, p. 800-6, Feb 1998.
- CARRERA-SILVA, E. A. *et al.* Importance of TLR2 on hepatic immune and non-immune cells to attenuate the strong inflammatory liver response during *Trypanosoma cruzi* acute infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 11, p. e863, 2010.
- CARRERO, L. L. *et al.* New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 5, p. 605-12, May 2008.
- CASOTTO, M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 6, p. 1188-93, Jun 1990.
- CAVASSANI, K. A. *et al.* Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. **J Immunol**, v. 177, n. 9, p. 5811-8, Nov 1 2006.
- CHAKRAVARTY, J. *et al.* A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 29, n. 19, p. 3531-7, Apr 27 2011.
- CHENG, C. *et al.* A TLR2 agonist is a more effective adjuvant for a *Chlamydia major* outer membrane protein vaccine than ligands to other TLR and NOD receptors. **Vaccine**, v. 29, n. 38, p. 6641-9, Sep 2 2011.
- CLARK, E. D. Protein refolding for industrial processes. **Curr Opin Biotechnol**, v. 12, n. 2, p. 202-7, Apr 2001
- COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 492-503, Oct 29 2010.
- COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycol**, v. 49, n. 8, p. 785-98, Nov 2011.
- COLTRI, K. C. *et al.* Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF-alpha production by macrophages. **Microbes Infect**, v. 8, n. 3, p. 704-13, Mar 2006.
- COLTRI, K. C. *et al.* Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **Am J Pathol**, v. 173, n. 2, p. 423-32, Aug 2008.
- COLTRI, K. C. *et al.* Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. **Medical Mycol**, v. 48, n. 6, p. 792-9, Sep 2010.

- COSTA, T. A. *et al.* In pulmonary paracoccidioidomycosis IL-10 deficiency leads to increased immunity and regressive infection without enhancing tissue pathology. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 10, p. e2512, 2013.
- COUTINHO, Z. F. *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441-54, Sep-Oct 2002.
- COUTINHO, Z. F. *et al.* Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). **Trop Med Int Health**, v. 20, n. 5, p. 673-80, May 2015.
- COX, J. C.; COULTER, A. R. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v. 15, n. 3, p. 248-56, Feb 1997.
- CROTT, L. S. *et al.* The role of the complement system in the neutrophil functions stimulated in vitro by an alkali-insoluble cell wall fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol**, v. 31, n. 1, p. 17-27, 1993.
- CYKTOR, J. C.; TURNER, J. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. **Infect Immu**, v. 79, n. 8, p. 2964-73, Aug 2011.
- DA SILVA, A. M.; BORBA, C. M.; DE OLIVEIRA, P. C. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. **Mycoses**, v. 37, n. 5-6, p. 165-9, Jun-Jul 1994.
- DA SILVA JDE, F. *et al.* Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 84, n. 1, p. 87-94, Jan 2016.
- DE ALMEIDA, S. M. Central nervous system paracoccidioidomycosis: an overview. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 2, p. 126-33, Apr 2005.
- DE ARRUDA GROSSKLAUS, D. *et al.* Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. **Microbes Infect**, v. 15, n. 5, p. 347-64, May 2013.
- DE BRITO, T.; FRANCO, M. F. Granulomatous inflammation. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 36, n. 2, p. 185-92, Mar-Apr 1994.
- DE CASTRO, L. F. *et al.* Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **J Infect**, v. 67, n. 5, p. 470-85, Nov 2013.
- DE GROOT, N. S.; VENTURA, S. Protein aggregation profile of the bacterial cytosol. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9383, 2010.
- DE OLIVEIRA, L. L. *et al.* T helper 1-inducing adjuvant protects against experimental paracoccidioidomycosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 3, p. e183, 2008.
- DEL NEGRO, G. M. *et al.* Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. **J Medical Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 37-46, Jan 2000.

DENNING, D. W.; BROMLEY, M. J. Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1414-6, Mar 27 2015.

DERENGOWSKI, L. S. *et al.* Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. **Medical Mycol**, v. 46, n. 2, p. 125-34, Mar 2008.

DIDIERLAURENT, A. M. *et al.* AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. **J Immunol**, v. 183, n. 10, p. 6186-97, Nov 15 2009.

DILLON, S. *et al.* A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. **J Immunol**, v. 172, n. 8, p. 4733-43, Apr 15 2004.

DINIZ, S. N. *et al.* In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Hum Immunol**, v. 62, n. 8, p. 799-808, Aug 2001.

DINIZ, S. N. *et al.* In vitro human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. **Microbes Infect**, v. 1, n. 5, p. 353-60, Apr 1999

DINIZ, S. N. *et al.* Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v. 22, n. 3-4, p. 485-92, Jan 2 2004.

DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 13, p. 6127-45, Jul 11 1988.

EMBRY, C. A. *et al.* Mechanism of impaired NLRP3 inflammasome priming by monophosphoryl lipid A. **Science Signal**, v. 4, n. 171, p. ra28, 2011.

FELONATO, M. *et al.* Anti-CD25 treatment depletes Treg cells and decreases disease severity in susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e51071, 2012.

FERNANDES, V. C. *et al.* Additive effect of rPb27 immunization and chemotherapy in experimental paracoccidioidomycosis. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17885, 2011a.

_____. The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect**, v. 13, n. 12-13, p. 1062-72, Nov 2011b.

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, n. 2, p. 121-6, Mar 15 2006.

- FERREIRA, K. S. *et al.* Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. **J Infect Dis**, v. 196, n. 7, p. 1108-15, Oct 1 2007.
- FERREIRA, M. C. *et al.* Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 78, n. 10, p. 4392-401, Oct 2010.
- FORTES, M. R. *et al.* Immunology of paracoccidioidomycosis. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 3, p. 516-24, May-Jun 2011.
- FRANCO, M., M. R. MONTENEGRO, *et al.* Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.20, n.2, p.129-32. 1987.
- FRANCO, M. *et al.* Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr Top Med Mycol**, v. 5, p. 115-49, 1993.
- FREUND, J. The mode of action of immunologic adjuvants. **Bibl Tuberc.**, v.10, p.130-48, 1956.
- FREUND, J.; CASALS, J.; HOSMER, E. P. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. **Proc Soc Exp Biol Med**. v. 37, p. 509–513. 1937.
- GESZTESI, J. L. *et al.* Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. **Hybridoma**, v. 15, n. 6, p. 415-22, Dec 1996.
- GOES, T. S. *et al.* Identification of immunogenic proteins from *Paracoccidioides brasiliensis* antigenic fractions F0, FII and FIII. **Immunol Lett**, v. 101, n. 1, p. 24-31, Oct 15 2005.
- GONZÁLES-OCHOA, A. Theories regarding the portal entry of *Paracoccidioides brasiliensis*: a brief review. **PAHO Sci Publ**, v. 254, p. 278-80, 1972.
- GONZALEZ, A. *et al.* Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2546-52, May 2000.
- HAMILTON, A. J. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii; current status and future trends. **Medical Mycol**, v. 36, n. 6, p. 351-64, Dec 1998.
- HENINGER, E. *et al.* Characterization of the *Histoplasma capsulatum*-induced granuloma. **J Immunol**, v. 177, n. 5, p. 3303-13, Sep 1 2006.
- HEO, D. R. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* *lpdC*, Rv0462, induces dendritic cell maturation and Th1 polarization. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 411, p. 642–47, 2011.

- HERNANDEZ-SANTOS, N.; GAFFEN, S. L. Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. **Cell host & microbe**, v. 11, n. 5, p. 425-35, May 17 2012.
- HERNANDEZ-SANTOS, N. *et al.* Th17 cells confer long-term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. **Mucosal Immunol**, v. 6, n. 5, p. 900-10, Sep 2013.
- HUANG, L.; HINCHMAN, M.; MENDEZ, S. Coinjection with TLR2 agonist Pam3CSK4 reduces the pathology of leishmanization in mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3, p. e0003546, Mar 2015.
- HUNTER, R. L. Overview of vaccine adjuvants: present and future. **Vaccine**, v. 20 Suppl 3, p. S7-12, May 31 2002.
- JIMENEZ-FINKEL, B. E.; MURPHY, J. W. Induction of antigen-specific T suppressor cells by soluble *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. **Infect Immun**, v. 56, n. 4, p. 734-43, Apr 1988.
- KASHINO, S. S. *et al.* Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **J Interferon Cytokine Res**, v. 20, n. 1, p. 89-97, Jan 2000.
- KOOL, M.; FIERENS, K.; LAMBRECHT, B. N. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. **J Medical Microbiol**, v. 61, n. Pt 7, p. 927-34, Jul 2012.
- KUNDI, M. New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system. **Expert Rev Vaccines**, v. 6, n. 2, p. 133-40, Apr 2007.
- LIMA PDE, S. *et al.* Transcriptional and proteomic responses to carbon starvation in *Paracoccidioides*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 5, p. e2855, May 2014.
- LORENZ, M. C.; BENDER, J. A.; FINK, G. R. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1076-87, Oct 2004.
- LOURES, F. V. *et al.* TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. **Front Microbiol**, v. 6, p. 261, 2015.
- LOURES, F. V. *et al.* Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infect Immun**, v. 78, n. 3, p. 1078-88, Mar 2010.
- LOURES, F. V. *et al.* TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 1279-90, Jul 15 2009.

- MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, v. 32, n. 1, p. 20-9, Oct 7 2005.
- MARCOS, C. M. *et al.* The multifaceted roles of metabolic enzymes in the *Paracoccidioides* species complex. **Front Microbiol**, v. 5, p. 719, 2014.
- MARQUES, A. F. *et al.* Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 10, n. 12-13, p. 1251-8, Oct 2008.
- MARQUES, A. F. *et al.* Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 8, p. 2814-9, Aug 2006.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 5, p. 700-11, Sep-Oct 2013.
- MARRACK, P.; MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 4, p. 287-93, Apr 2009.
- MARTINEZ, R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 57 Suppl 19, p. 11-20, Sep 2015.
- MATA-HARO, V. *et al.* The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. **Science**, v. 316, n. 5831, p. 1628-32, Jun 15 2007.
- MATUTE, D. R. *et al.* Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73, Jan 2006.
- MCCLUSKIE, M. J.; WEERATNA, R. D. Novel adjuvant systems. **Curr Drug Targets Infect Disord**, v. 1, n. 3, p. 263-71, Nov 2001.
- MEIRA, D. A. *et al.* The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, n. 5, p. 496-503, Nov 1996.
- MENDES, R. P. The gamut of clinical manifestations of paracoccidioidomycosis. In: Franco, M. F., C. S. Lacaz, *et al* (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.131-150.
- MORAIS, E. A. *et al.* TLR 9 involvement in early protection induced by immunization with rPb27 against Paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infect**, v. 18, n. 2, p. 137-47, Feb 2016.
- MORAIS, E. A. *et al.* Immunization with recombinant Pb27 protein reduces the levels of pulmonary fibrosis caused by the inflammatory response against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 179, n. 1-2, p. 31-43, Feb 2015.

- MUNOZ, J. E. *et al.* Immunization with P10 peptide increases specific immunity and protects immunosuppressed BALB/c mice infected with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3-4, p. 177-88, Oct 2014.
- NARANJO, T. W. *et al.* Combined itraconazole-pentoxifylline treatment promptly reduces lung fibrosis induced by chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in mice. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 24, n. 1, p. 81-91, Feb 2011.
- NASCIMENTO, F. R. *et al.* Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J Immunol**, v. 168, n. 9, p. 4593-600, May 1 2002.
- NEGRONI, R. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lutz's mycosis). **Int J Dermatol**, v. 32, n. 12, p. 847-59, Dec 1993.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. Lehninger principles of biochemistry. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2005.
- O'HAGAN, D. T. Recent developments in vaccine delivery systems. **Curr Drug Targets Infect Disord**, v. 1, n. 3, p. 273-86, Nov 2001.
- OKAMOTO YOSHIDA, Y. *et al.* Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. **J Immunol**, v. 184, n. 8, p. 4414-22, Apr 15 2010.
- OLAFSDOTTIR, T.; LINDQVIST, M.; HARANDI, A. M. Molecular signatures of vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 33, n. 40, p. 5302-7, Sep 29 2015.
- OLIVEIRA, S. J. *et al.* Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes and Infect**, v. 4, n. 2, p. 139-44, Feb 2002.
- OPIE, E. L.; FREUND, J. An experimental study of protective inoculation with heat killed tubercle bacilli. **J Exp Med**. v.66, n.6, p.761-88, 1937
- OSCHERWITZ, J. *et al.* Low-dose intraperitoneal Freund's adjuvant: toxicity and immunogenicity in mice using an immunogen targeting amyloid-beta peptide. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 3018-25, Apr 5 2006.
- PAAVONEN, J. *et al.* Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. **Lancet**, v. 369, n. 9580, p. 2161-70, Jun 30 2007.
- PAGLIARI, C. *et al.* Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. **Microb Pathog**, v. 50, n. 5, p. 263-7, May 2011.

- PANUNTO-CASTELO, A. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Microbes Infection**, v. 5, n. 13, p. 1205-11, Nov 2003
- PARENTE-ROCHA, J. A. *et al.* Macrophage Interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Cells Modulates Fungal Metabolism and Generates a Response to Oxidative Stress. **PLoS one**, v. 10, n. 9, p. e0137619, 2015.
- PERACOLI, M. T.; MOTA, N. G.; MONTENEGRO, M. R. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster. Morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. **Mycopathologia**, v. 79, n. 1, p. 7-17, Jul 23 1982.
- PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. **Immunol Cell Biol**, v. 82, n. 5, p. 488-96, Oct 2004.
- PHILLIPS, K.; WEINBLATT, M. Granulomatous lung disease occurring during etanercept treatment. **Arthritis Rheumatol**, v. 53, n. 4, p. 618-20, Aug 15 2005.
- PINA, A. *et al.* Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 6, p. 1202-13, Jun 2006.
- PINA, A. *et al.* Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2369-78, Apr 2004.
- PROENCA, N. G.; CASTRO, R. M.; ALONSO, F. F. [Benign course of paracoccidioidomycosis of possible cutaneous inoculation]. **AMB Rev Assoc Med Bras**, v. 27, n. 6, p. 170-2, Jun 1981.
- PUCCIA, R. *et al.* Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect Immun**, v. 53, n. 1, p. 199-206, Jul 1986.
- PUCCIA, R.; TAKAOKA, D. T.; TRAVASSOS, L. R. Purification of the 43 kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 1, p. 57-60, 1991.
- RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 281-303, 2006.
- REIS, B. S. *et al.* Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v. 26, n. 43, p. 5461-9, Oct 9 2008.
- RESTREPO, A.; CANO, L. E.; TABARES, A. M. A comparison of mycelial filtrate - and yeast lysate - paracoccidioidin in patients with paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 84, n. 1, p. 49-54, Dec 1 1983.
- RESTREPO, A.; GÓMEZ, B. L.; TOBÓN, A. Paracoccidioidomycosis: Latin America's Own Fungal Disorder. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 6, p. 303-11, 2012.

RITTNER, G. M. *et al.* Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1519, 2012.

ROBLEDO, M. A. *et al.* Host defense against experimental paracoccidioidomycosis. **Am Rev Respir Dis**, v. 125, n. 5, p. 563-7, May 1982.

Rodrigues, M. L. *et al.* Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 1, p. 48-59. 2007.

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

_____. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 4, p. 275-88, Apr 2011.

SABATE, R.; DE GROOT, N. S.; VENTURA, S. Protein folding and aggregation in bacteria. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 16, p. 2695-715, Aug 2010.

SAN-BLAS, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. **Curr Top Med Mycol**, v. 1, p. 235-57, 1985

SCHIJNS, V. E. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. **Crit Rev Immunol**, v. 21, n. 1-3, p. 75-85, 2001.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis Treatment. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 57 Suppl 19, p. 31-7, Sep 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, May-Jun 2006.

SIDRIM, J. J. E. M. F. G. ROCHA. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 388p.

SOUTO, J. T. *et al.* Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am J Pathol**, v. 156, n. 5, p. 1811-20, May 2000.

SPARBER, F.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. Interleukin 17-Mediated Host Defense against *Candida albicans*. **Pathogens**, v. 4, n. 3, p. 606-19, 2015.

STILLS, H. F., JR. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **ILAR J**, v. 46, n. 3, p. 280-93, 2005.

TABORDA, C. P. *et al.* Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect Immun**, v. 66, n. 2, p. 786-93, Feb 1998.

TABORDA, C. P. *et al.* Paracoccidioidomycosis: Challenges in the Development of a Vaccine against an Endemic Mycosis in the Americas. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 57 Suppl 19, p. 21-4, Sep 2015.

TAVARES, A. H. *et al.* Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. **Microbes Infect**, v. 9, n. 5, p. 583-90, Apr 2007.

TEIXEIRA, M. M. *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol**, v. 52, n. 2, p. 273-83, Aug 2009.

TEIXEIRA, M. M. *et al.* *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 10, p. e1004397, Oct 2014.

THEODORO, R. C. *et al.* Genus *paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37694, 2012.

THOMPSON, B. S. *et al.* The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 6, p. 1273-80, Dec 2005.

TORRES, I. *et al.* Inhibition of PbGP43 expression may suggest that gp43 is a virulence factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68434, 2013.

TOUSSI, D. N.; MASSARI, P. Immune Adjuvant Effect of Molecularly-defined Toll-Like Receptor Ligands. **Vaccines**, v. 2, n. 2, p. 323-53, 2014.

VICENTINI, A. P. *et al.* Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 62, n. 4, p. 1465-9, Apr 1994.

VIEIRA GDE, D. *et al.* Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 63-8, Jan-Feb 2014.

WEBER, S. S. *et al.* Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides* mycelia and yeast cells. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e52470, 2012.

8. ANEXO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

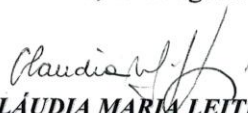


CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 105/2007, sobre o projeto intitulado “*Identificação de antígenos de Paracoccidioides brasiliensis reconhecidos pelo sistema imunológico de camundongos imunes a este fungo. Busca por alvos vacinais na Paracoccidioidomicose*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Ademilson Panunto Castelo**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **27 de agosto de 2007**.

(We certify that the protocol nº 105/2007, about “*Identification of Paracoccidioides brasiliensis antigens recognized by immune system T cells from immune mice. Search for vaccine targets on paracoccidioidomycosis*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 08/27/2007 meeting).

Ribeirão Preto, 28 de agosto de 2007.


Profa. Dra. CLÁUDIA MARIA LEITE MAFFEI
Presidente, em exercício, da Comissão de Ética
em Experimentação Animal

9. APÊNDICES

Artigo aceito para publicação



Medical Mycology, 2016, 0, 1–5
doi: 10.1093/mmy/myw074
Advance Access Publication Date: 0 2016
Brief Report



Brief Report

Therapeutic effect of monophosphoryl lipid A administration on *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice

Q1 5 **Taise Natali Landgraf¹, Fabrício Freitas Fernandes², Gabriela Peron³**
Q2 **and Ademilson Panunto-Castelo^{4,*}**

1Department of Biochemistry and Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, 2Department of Cellular and Molecular Biology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, 3Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, SP and 4Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Q3 *To whom correspondence should be addressed. Ademilson Panunto-Castelo, E-mail: apcastelo@usp.br

15 Received 31 March 2016; Revised 25 July 2016; Accepted 28 July 2016

Abstract

The lack of antifungals with low toxicity and short-term therapy for patients with paracoccidioidomycosis (PCM) led us to evaluate adjuvants in immunotherapeutic intervention. We have previously shown complete Freund's adjuvant (CFA) to be therapeutic on experimental PCM. Owing to CFA toxicity, here we tested adjuvants approved for clinical use or in preclinical phase in experimental mouse PCM. Of all, only monophosphoryl lipid A (MPLA) demonstrates a beneficial effect, by reducing the fungal burden and increasing the concentrations of IFN- γ and TNF- α , which are immunoprotective in PCM. These results suggest that MPLA might improve intervention in PCM.

25 **Key words:** *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, monophosphoryl lipid A, immunotherapy, adjuvants.

Q4 Paracoccidioidomycosis (PCM) is a chronic granulomatous mycosis caused by thermally dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides*.¹ PCM is the most important systemic mycosis in Latin America. In Brazil, PCM is the eighth most important cause of mortality among chronic infectious diseases.²

30 Regarding to immunological response, type 1 helper T cells (Th1) are immunoprotective in PCM. These cells initially secrete high levels of TNF- α and IFN- γ , followed by continuous production of interleukin (IL)-2 and

IFN- γ . On the other hand, susceptibility was linked to depressed cellular immunity, characterized by Th2 immune response with secretion of IL-4, IL-5, IL-10, and TGF- β .^{3,4}

40 Currently, conventional treatments include sulfone and azole derivatives. In severe and disseminated forms of PCM, amphotericin B has been used.² Frequently, treatment with these agents is protracted and the main concerns are non-compliance, side effects such as toxicity, and drug resistance in anergic patients.⁵ These concerns have motivated some

groups to search for alternatives therapies by using murine models,⁶⁻⁹ as well as in PCM patients.¹⁰

The small number of studies on therapeutic intervention with immunostimulatory molecules reveals a demand for new approaches that could help severely ill patients with an impaired immune response. Previously, our group has shown that CFA, a well-established inductor of the Th1 immune response, has a therapeutic effect in *P. brasiliensis*-infected mice.¹¹ As CFA is not licensed for use in humans because of its toxicity,¹² we sought to address the role of immunomodulation of adjuvants licensed or in the testing phase for use in humans for treatment of experimental PCM.

Male BALB/c mice, 6–8 weeks old, were purchased from the Central Animal House of the Ribeirão Preto, University de São Paulo (USP). This work followed the ethical principles of the Brazilian Laboratory Animal Science Association (SBCAL) and was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Ribeirão Preto Medical School, USP. The protocol number is 105/2007.

Yeasts of a virulent *P. brasiliensis* strain (Pb18) were cultured for 7 days at 36°C in Ham's F-12 Nutrient Mixture (Life Technologies, Carlsbad, USA) supplemented with 4% fetal bovine serum. Viability was determined as described.¹³ Fungal suspensions with > 90% viable cells were used.

The mice were intratracheally inoculated with 3×10^5 yeasts. The treatment protocol and preparation of CFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) were done as described.¹¹ Groups of five infected animals were subcutaneously injected into the dorsum on day 20 after infection with 100 μ L of one of the following adjuvants: (1) CFA emulsified in PBS in a ratio of 1:1, (2) monophosphoryl lipid A (MPLA) from *Salmonella minnesota* and (3) PAM₃CSK₄ (both from Invivogen, San Diego, California) both at a dose of 20 μ g, as recommended by manufacturer, and (4) Adjuvant System 04 (AS04), at a dose of 5 μ g of MPLA from *Bordetella pertussis* + 50 μ g of aluminum hydroxide (alum),¹⁴ or (5) 50 μ g of alum. The control infection group was injected with PBS. After 30 days of treatment, the lungs were removed, homogenized and plated on petri dishes containing BHI agar (Oxoid Limited, Basingstoke, UK) supplemented with 4% (v/v) fetal bovine serum. The plates were incubated at 36°C for 7 days. The results were expressed as numbers of cfu per gram of tissue (cfu/g).

Cytokine levels were determined in supernatants from lung homogenates using the BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Pharmingen, San Diego, USA), according to the manufacturer's recommendations.

Lungs were fixed with 10% formalin and embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin and eosin or Grocott stain and examined microscopically at optical microscope (Axio photomicroscope - Zeiss, Jena, Germany).

Data were analyzed with the ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post-test using GraphPad Prism 5 software. Differences with $P < .05$ were considered statistically significant.

In this study, we investigated the therapeutic activity of four adjuvant formulations. Alum was chosen because it is the most frequently used adjuvant in human vaccinations, although it stimulates a Th2-mediated immune response,¹⁵ which does not induce protection in PCM. Of the adjuvants that stimulate TLRs, we selected MPLA and PAM₃CSK₄, agonists of TLR4 and TLR2 respectively; and AS04, a combination of MPLA and alum. MPLA, Th1 inducing adjuvant, retains a potent immunostimulatory activity while lacking toxicity.¹⁶ Of all, only MPLA protected against *P. brasiliensis* infection. When the number of *P. brasiliensis* cfu from MPLA-treated mice was compared to that in control group, we observed a significant reduction in cfu in the lungs, that is, 0.36×10^5 cfu/g \pm 0.10 in MPLA-treated mice and 5.47×10^5 cfu/g \pm 0.15 in controlled ones (Figure 1A). In contrast, no statistically significant difference in cfu was seen in PAM₃CSK₄ (5.35×10^5 cfu/g \pm 2.63), alum (4.83×10^5 cfu/g \pm 1.47), and AS04 (6.77×10^5 cfu/g \pm 2.29).

On the basis of these screening results, we investigated lung histology and cytokines in the homogenates from MPLA-treated mice and control mice. The histopathological analysis showed a reduction in lesion area, inflammatory infiltrate, and compact and delimited granulomas; the finding was in accordance with the cfu results. In contrast, the lungs of control mice exhibited confluent granulomas and extensive tissue damage (Figure 1B–G). Further, silver-stained sections showed that the number of *P. brasiliensis* yeast cells in the lungs of control mice were higher than those in the lungs of CFA- or MPLA-treated mice, suggesting that the administration of these adjuvants contributes to fungal clearance (Figure 1H–J).

Because MPLA therapy clearly showed promising results, these outcomes could be related with the immune response. Therefore, we determined the concentration of pro- and anti-inflammatory cytokines in the supernatants of lung homogenates from groups of *P. brasiliensis*-infected mice. Interestingly, infected mice treated with CFA and MPLA had high concentrations of the inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α compared to the concentrations in control mice. In contrast, control mice showed IL-4 and IL-10 concentrations that were significantly higher

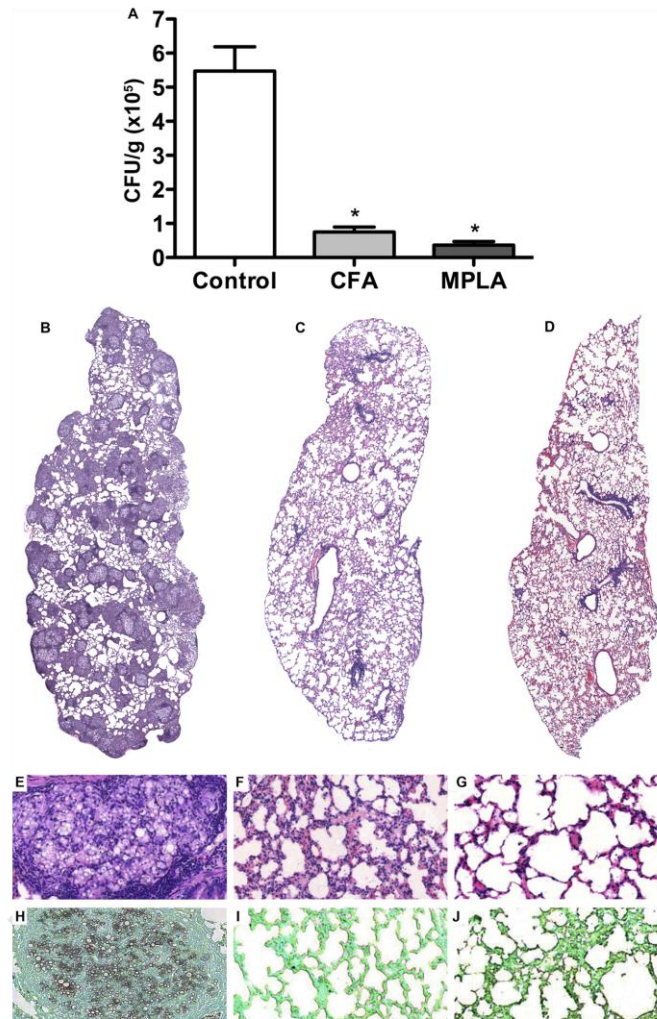


Figure 1. *P. brasiliensis*-infected mice treated therapeutically with MPLA showed significant reduction in lung fungal burden. (A) BALB/c mice infected intratracheally with 3×10^5 *P. brasiliensis* yeast cells were divided into three groups and injected with PBS (control), CFA, or MPLA on day 20 after infection. Lung homogenates were analyzed 30 days after treatment, i.e., 50 days after infection, to determine the fungal burden by cfu assay. Assays were carried out in triplicate with samples from five mice per group and the results represent the mean \pm SEM of three independent experiments. * $P < .05$ versus control group. (B–J) Lung histology of infected mice injected with PBS (B, E, and H) or treated with CFA (C, F, and I) or MPLA (D, G, and J) on day 20 after infection. The lung sections were obtained 30 days after the treatments and stained with H&E (B–G) or Grocott stain (H–J). Scale bars: A–C = 1 mm; D–J = 200 μ m.

than those of MPLA- and CFA-treated animals (Figure 2).
 150 IFN- γ increases in the clearance of fungal cells and expression of inflammatory mediators by macrophages. IFN- γ in synergy with TNF- α has been shown to be critical for the resistance in PCM.¹⁷ In contrast, IL-10 is considered a mediator that facilitates infection,¹⁸ although it is also able

to prevent the immunopathogenic effects of Th1 immune
 155 response.¹⁹

Interestingly, groups that received CFA or MPLA showed levels of IL-17 similar to those in the control group. In experimental PCM, the involvement of IL-17 response is poorly defined. Pagliari et al. demonstrated
 160

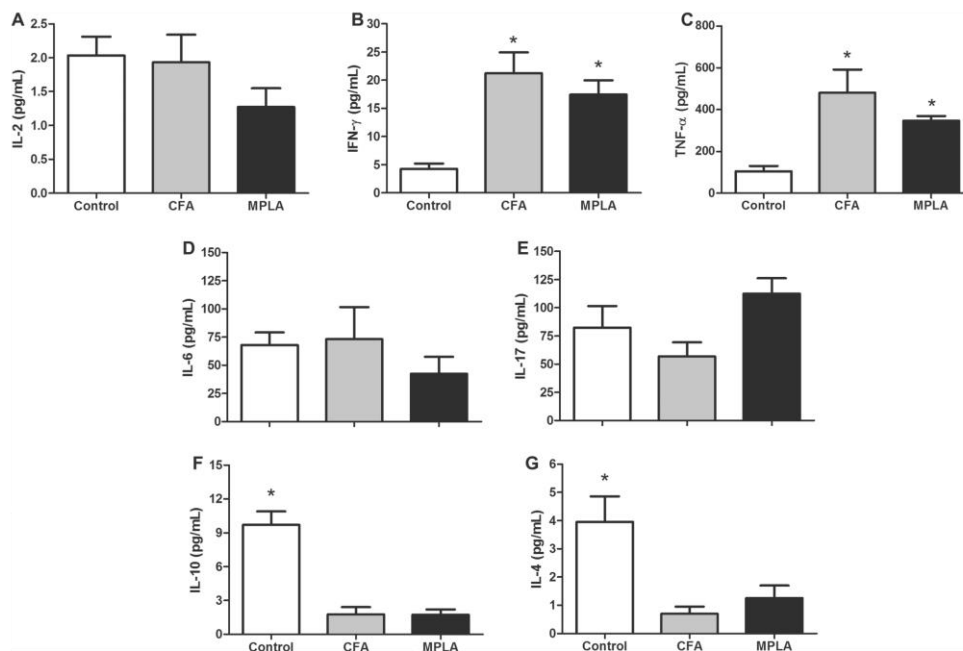


Figure 2. *P. brasiliensis*-infected mice treated therapeutically with MPLA showed increase Th1 cytokine production. *P. brasiliensis*-infected BALB/c mice were injected with PBS (control), CFA, or MPLA on day 20 after infection. Lung homogenates were analyzed 30 days after treatment, i.e., 50 days after infection, to determine concentrations of (A) IL-2, (B) IFN- γ , (C) TNF- α , (D) IL-6, (E) IL-17, (F) IL-10, and (G) IL-4. Assays were carried out in triplicate with samples from five mice per group. The results represent the mean \pm SEM of two independent experiments. * $P < .05$ versus control group.

IL-17-expressing cells in cutaneous and mucosal lesions in PCM; the cells appeared to be associated with the organization of granulomas.²⁰ Taken together, our results suggest that the protection conferred by MPLA administration could be associated with a noticeable increase in the pulmonary concentrations of the proinflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α and decreased levels of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10, which probably changed the insufficient immune response to one resulting in control of fungal infection in the nontreated infected mice.

In summary, this work is the first to report the efficacy of MPLA in the treatment of PCM in an experimental model. This finding offers perspectives for the development of a model of immunotherapeutic intervention and the use as an adjuvant therapy for the treatment of PCM.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo [grant number 2012/08552-0 and 2013/12278-3]. The authors thank Izaira Tincani Brandão and Ana Paula Masson for their

helpful assistance in infection procedures; Wander Cosme Ribeiro da Silva and Elaine Medeiros Floriano for their helpful support in histology, and the Butantan Institute, São Paulo, Brazil, for kindly provided AS04.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

References

- Martinez R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2015; 57 (Suppl 19): 11–20.
- Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiol* 2013; 8: 1177–1191.
- Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 2008; 165: 209–221.
- Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with

Q5

180

185

Q6

190

195

- 200 absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 89–97.
5. Benard G, Campos AF, Netto LC et al. Treatment of severe forms of paracoccidioidomycosis: is there a role for corticosteroids? *Med Mycol* 2012; 6: 641–648.
- 205 6. Alegre-Maller AC, Mendonca FC, da Silva TA et al. Therapeutic administration of recombinant paracoccin confers protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection: involvement of TLRs. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e3317.
7. Coltri KC, Oliveira LL, Pinzan CF et al. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a Toll-like receptor 2-dependent mechanism. *Am J Pathol* 2008; 173: 423–432.
- 210 8. Morais EA, Martins EM, Boelone JN et al. Immunization with recombinant Pb27 protein reduces the levels of pulmonary fibrosis caused by the inflammatory response against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 2015; 179: 31–43.
9. Munoz JE, Luft VD, Amorim J et al. Immunization with P10 peptide increases specific immunity and protects immunosuppressed BALB/c mice infected with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 2014; 178: 177–188.
- 220 10. Meira DA, Pereira PC, Marcondes-Machado J et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 496–503.
- 225 11. de Oliveira LL, Coltri KC, Cardoso CR et al. T helper 1-inducing adjuvant protects against experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: e183.
12. O'Hagan DT. Recent developments in vaccine delivery systems. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2001; 1: 273–286.
13. Calich VL, Purchio A, Paula CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia*. 1979; 66: 175–177. 230
14. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman S et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol* 2009; 183:6186–6197.
15. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol* 2013; 4: 114. 235
16. Toussi DN, Massari P. Immune adjuvant effect of molecularly-defined Toll-like receptor ligands. *Vaccines (Basel)* 2014; 2: 323–353.
17. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol* 2000; 156: 1811–1820. 240
18. Ferreira KS, Bastos KR, Russo M et al. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and Toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *J Infect Dis* 2007; 196: 1108–1115. 245
19. Cyktor JC, Turner J. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. *Infect Immun* 2011; 79: 2964–2973. 250
20. Pagliari C, Fernandes ER, Stegun FW et al. Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. *Microb Pathog* 2011; 50: 263–267.

Artigo aceito para publicação

From: "PLOS ONE" <em@editorialmanager.com>

Subject: Notification of Formal Acceptance for PONE-D-16-14342R1 -
[EMID:6121a8f4c1453cdb]

Date: August 26, 2016 at 16:49:35 GMT-3

To: "Ademilson Panunto-Castelo" <apcastelo@usp.br>

Reply-To: "PLOS ONE" <plosone@plos.org>

CC: fabsff@usp.br, leandro.licursi@ufv.br, taise.landgraf@usp.br,
gabriela88peron@gmail.com, marcelo.vieira.costa@usp.br, arlete@fmrp.usp.br,
vlbonato@fmrp.usp.br, mcrbarre@fmrp.usp.br

PONE-D-16-14342R1

Detrimental Effect of Fungal 60-kDa Heat Shock Protein on Experimental
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Infection

Dear Dr. Panunto-Castelo:

I am pleased to inform you that your manuscript has been deemed suitable for publication in PLOS ONE. Congratulations! Your manuscript is now with our production department.

If you or your institution will be preparing press materials for this manuscript, you must inform our press team in advance. Your manuscript will remain under strict press embargo until 2 pm Eastern Time on the date of publication. For more information please contact onepress@plos.org.

For any other questions or concerns, please email plosone@plos.org.

Thank you for submitting your work to PLOS ONE.

With kind regards,

PLOS ONE Editorial Office Staff

on behalf of

Dr. Floyd L. Wormley, Jr.

Academic Editor

PLOS ONE

**Detrimental Effect of Fungal 60-kDa Heat Shock Protein on
Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* Infection**

Authors: Fabrício Freitas Fernandes¹, Leandro Licursi Oliveira², **Taise Natali Landgraf³**, Gabriela Peron⁴, Marcelo Vieira Costa⁵, Arlete A. M. Coelho-Castelo³, Vânia L. D. Bonato³, Maria-Cristina Roque-Barreira¹ and Ademilson Panunto-Castelo^{5*}

1 Department of Cellular and Molecular Biology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil;

2 Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil;

3 Department of Biochemistry and Immunology, *School* of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil;

4 Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

5 Department of Biology, Ribeirão Preto Faculty of Philosophy, Sciences and Letters, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil;

*Corresponding author

Email: apcastelo@usp.br

Abstract

The genus *Paracoccidioides* comprises species of dimorphic fungi that cause paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic disease prevalent in Latin America. Here,

we investigated whether administration of native 60-kDa heat shock protein of *P. brasiliensis* (nPbHsp60) or its recombinant counterpart (rPbHsp60) affected the course of experimental PCM. Mice were subcutaneously injected with nPbHsp60 or rPbHsp60 emulsified in complete's Freund Adjuvant (CFA) at three weeks after intravenous injection of *P. brasiliensis* yeasts. Infected control mice were injected with CFA or isotonic saline solution alone. Thirty days after the nPbHsp60 or rPbHsp60 administration, mice showed remarkably increased fungal load, tissue inflammation, and granulomas in the lungs, liver, and spleen compared with control mice. Further, rPbHsp60 treatment (i) decreased the known protective effect of CFA against PCM and (ii) increased the concentrations of IL-17, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10, and TGF- β in the lungs. Together, our results indicated that PbHsp60 induced a harmful immune response, exacerbated inflammation, and promoted fungal dissemination. Therefore, we propose that PbHsp60 contributes to the fungal pathogenesis.

Introduction

The genus *Paracoccidioides* includes species of dimorphic fungi that cause paracoccidioidomycosis (PCM), a granulomatous systemic mycosis prevalent in Latin America [1-3]. *Paracoccidioides* fungi are thermally dimorphic and grow as hypha at the environmental temperature and as yeast at 35°C-37°C. Fungal morphologic transition is essential for establishing an infection because infective conidia or mycelial fragments are inhaled and converted to pathogenic yeast forms in the host lungs [4, 5]. Prevalence of PCM is higher in men in rural areas who are involved in activities related to the management of contaminated soil and plants [6]. *P. brasiliensis* may also affect immunocompromised individuals as an occasional opportunistic infection that results in

severe clinical manifestations and a high mortality rate [7]. Fungal invasion of host tissues induces inflammation characterized by macrophage activation and granuloma formation, which controls the dissemination of *Paracoccidioides* yeasts to other organs [8].

Clinical manifestations of *Paracoccidioides* infection may be directly associated with fungal factors, such as virulence and pathogenicity [9], or are related to host factors, such as genetic susceptibility and immune competence [10, 11]. However, fungal and host factors are intricately connected to each other because disease outcome depends on the interaction of fungal components with receptors on host phagocytic cells [12]. For this reason, strains of *P. brasiliensis*, which is the most studied species of the genus *Paracoccidioides*, have variable degrees of virulence and, consequently, can induce different host responses [13]. Interestingly, Bonfim et al. [13] described that less virulent *P. brasiliensis* strain is preferably recognized by receptors dectin-1 and Toll-like receptor (TLR) 2 present on innate immune cells and induce the production of balanced amounts of TNF- α and IL-10. On the other hand, most virulent *P. brasiliensis* strain promotes the production of TNF- α but not IL-10. These observations suggest that less virulent *P. brasiliensis* strains induce a more controlled response because IL-10, an anti-inflammatory cytokine, prevents host tissue injury that may result from TNF- α activity [13].

Several studies have identified and characterized components of *Paracoccidioides* fungi involved in their infection and pathogenicity to better understand their biology and interactions with host cells and to identify potential vaccine targets. Lipids, polysaccharides, and proteins were already mentioned as able to increase fungal pathogenicity [14, 15]. Studies with plasmid DNA cloned with the gene of heat shock protein (Hsp) of 65-kDa from *Mycobacterium leprae* [16] and with the gene encoding

the P10 peptide from gp43 [17] have shown therapeutic effects in experimental PCM. *P. brasiliensis* proteins are the most studied because of their high immunogenicity. For example, gp43, which is the most studied component of *P. brasiliensis* yeasts, has significant potential for application in vaccine development or immunotherapy against PCM [15]. Also, a 27-kDa component of *P. brasiliensis* is under investigation for its use in the prophylaxis and treatment of PCM [18]. The rPb27 and rPb40, in addition to fluconazole chemotherapy, showed an additive protective effect [19, 20]. Moreover, the *P. brasiliensis* lectin, paracoccin, by interacting with TLR2 N-glycans on host cells, establishes protective responses against PCM [21].

To identify *P. brasiliensis* antigens that contributed to its pathogenicity and that could serve as potential vaccines or therapeutic targets, we examined *P. brasiliensis* components that bind to immobilized fetuin. Interestingly, the major component of the fetuin-bound fraction was identified as the heat shock protein of *P. brasiliensis* and the preparation was designed as nPbHsp60. Its administration or the administration of its recombinant counterpart (rPbHsp60) induced detrimental effects in *P. brasiliensis*-infected mice. Therefore, we propose that PbHsp60 contributes to the fungal pathogenesis.

Materials and Methods

Mice and ethics statement

This study was conducted in accordance with the ethical principles of animal research adopted by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science and was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Ribeirão Preto Medical School, USP (protocol: 146/2007). Male BALB/c mice between 6-8 weeks of age and weighing 20-25 g (n = 5/group) were obtained from the Animal Facility of Ribeirão Preto Campus

and were maintained at the Animal Facility of Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo (USP). They were acclimated to the facility for one week prior to initiating the experiment, housed in individually ventilated cages, light-tight cabinets (Alesco, Capivari, Brazil), maintained at 20-22°C, a 12 h light-dark cycle, and with access to chow and water ad libitum. All cages were cleaned twice a week and bedded with autoclaved soft wood shavings.

Fungal isolate

Yeast cells of a highly virulent *P. brasiliensis* strain (Pb18) were cultured on YPD broth (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% dextrose) and were incubated at 36°C for 7 days. Virulence and viability of the yeast cells were maintained as described previously [22, 23]. Briefly, the virulence was maintained by constant mice infections and recovery of Pb18 strain. The viability was performed by the fluorescein diacetate-ethidium bromide treatment. Only suspensions containing >90% viable cells were used for infecting mice.

Antigen preparation

Cultured yeast cells were harvested by centrifugation at $7,000 \times g$ at 4°C for 10 minutes, washed with 10 mM phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and disrupted by sonication on ice (five cycles of 1 minute each) at 200 W (Unique UltraSonic Mixing, mod. DES 500, 4 mm probe; Unique Group, Indaiatuba, Brazil), followed by centrifugation at $7,000 \times g$ at 4°C for 10 minutes. Supernatant containing *P. brasiliensis* soluble antigens (PbAgs) was filtered through a 0.22- μ m filter (Millipore, Billerica, USA). Approximately 5 mg PbAgs were resolved by performing chromatography with a 5-mL fetuin-agarose column (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) that was

previously equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). After washing with 10 column volumes (cv) of the equilibrating buffer, the column was sequentially eluted using 5 cv of 0.4 M D-glucose, D-mannose, D-galactose, or α -lactose in PBS or with 1 M NaCl in PBS. The eluted fractions were dialyzed against water by using centrifugal filtration devices with a molecular weight cut-off of 10,000 kDa (Millipore). Concentration of proteins eluted with 1 M NaCl was determined using a BCA kit (Pierce Chemical Co., Rockford, USA).

Electrophoresis and protein identification

Eluted protein and rPbHsp60 (~5 μ g) were resuspended in 5 \times loading buffer (500 mM Tris-HCl [pH 6.5], 2.5% SDS, 10% glycerol, 2.5% β -mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue) and were heated at 100°C for 3 minutes. Next, the preparations were resolved by performing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 12.5% by using Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA). The gels were stained with Coomassie brilliant blue G250 (USB Corporation, Cleveland, USA). Proteins with known molecular masses were used as standards (LMW-SDS Marker Kit; GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, England). A semi-quantitative analysis of the relative amount of 68-kDa protein band was carried out by converting the density of protein bands in the gel picture using the ImageJ 1.37v software (National Institutes of Health, Bethesda, USA) as the percent of the total gel density. Next, 60-kDa bands from column-eluted fraction and rPbHsp60 were excised from the gel, were digested *in situ* with trypsin. Peptides were extracted from gel and dried in SpeedVac, resuspended in 50 μ l 1% formic acid, centrifuged and transferred to HPLC vial. Ten μ l sample was typically analyzed on the system. All mass spectrometry analyses were performed on an Agilent 6520 Q-TOF mass spectrometer

equipped with an Agilent 1200 series liquid chromatograph and an Agilent Chip Cube LC-MS interface (1D nLC-MS-MS) at the FingerPrint Proteomics and Mass Spectrometry Facility, College of Life Sciences, University of Dundee. Mascot (version 2.3; Matrix, United Kingdom) analysis was performed to identify peptides and to search for proteins in the NCBI nonredundant (nr) database. The identified peptides were searched against NCBI nr *E. coli* database to find possible bacterial protein contaminants in the sample.

Cloning of *P. brasiliensis* cDNA encoding PbHsp60

Total RNA was extracted from *P. brasiliensis* yeast culture by using Trizol (Life Technologies, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) was performed using oligo-dT₁₂₋₁₈ primer (Life Technology) and SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) for synthesizing cDNA. To amplify the cDNA region encoding PbHsp60 were used the oligonucleotide primers 5'-CGAATTCATGATGCAGCGAGCTTTTACTTCCT-3' (sense) and 5'-CTCGAGGAACATACCCCGCCCATAC-3' (antisense) and high-fidelity *Taq* polymerase (Life Technologies). The amplified fragment was cloned into pGEM-T vector (Promega, Madison, USA) and was sequenced at the Center for Human Genome Studies, Institute of Biosciences, USP. Next, the fragment was removed from the pGEM-T vector by using EcoRI and XhoI and was subcloned into pET28a vector (Novagen, San Diego, USA).

Expression and purification of rPbHsp60 in *Escherichia coli*

E. coli transformed with pET28a-*HSP60* vector were grown in LB medium (3 L) supplemented with kanamycin sulfate (50 μ g/mL) in a shaking incubator at 180 rpm

and 37°C until optical density at 600 nm reached 0.5. Next, 0.4 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside was added to the culture medium to induce the expression of the recombinant protein. After 6 hours, bacterial cells were harvested by centrifugation at $3,000 \times g$, were resuspended in a buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, and 30 mM imidazole [pH 8.0]), and were lysed by sonication. Lipopolysaccharide and other bacterial contaminants were removed from the sample by washing it at least five times with a buffer containing 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 2 M urea, 5 mM 2-mercaptoethanol, and 0.5% Triton X-100 (pH 8.0) through centrifugation at $10,000 \times g$ [24]. Pellet containing the insoluble fraction (inclusions bodies) was resuspended in a denaturing solubilization buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole, 7 M urea, 5 mM 2-mercaptoethanol, and 0.5% Tween 20 [pH 8.0]) and was incubated for 1 hour at room temperature. The denatured material was recovered by centrifugation at $10,000 \times g$ and was filtered through Millex-GV PVDF (pore size, 0.22 μ m; Millipore). The recombinant protein was purified by performing metal chelate affinity chromatography with a Ni²⁺-Sepharose affinity column (His-Trap; GE Healthcare). Next, the recombinant protein was eluted with elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 7 M urea, and 5 mM 2-mercaptoethanol), refolded by dialysis against PBS, and concentrated by ultrafiltration. Protein concentration was determined using Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Pierce Chemical Co.). Purity, size, and identity of the recombinant protein were evaluated using SDS-PAGE and 1D nLC-MS-MS, similar to those described above for column-eluted fraction. The rPbHsp60 preparation contained less than 0.05 ng/mL of bacterial endotoxin, as determined by the *Limulus amoebocyte* lysate assay (Sigma Chemical Co.).

Experimental treatment protocol

Mice were intravenously inoculated by retro-orbital plexus with 1×10^6 viable yeast cells and daily monitored for signs of distress or illness, and mortality. None of them became seriously ill or died prior to the experimental endpoint. On day 21 postinfection, the mice were divided into groups containing five animals each. In experiments involving nPbHsp60, the mice were subcutaneously injected with a single 100 μ L dose of one of the following preparations: (1) 25 μ g nPbHsp60 in PBS, (2) 25 μ g nPbHsp60 in PBS and emulsified in CFA (Sigma Chemical Co.) (nPbHsp60 + CFA, 1:1), (3) PBS emulsified in CFA, and (4) only PBS. In the experiments with recombinant protein, 50 μ g of rPbHsp60 were used. On day 30 after the treatment, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg) mixture and submitted to euthanasia by cervical dislocation. Their lungs, livers, and spleens were removed aseptically for performing histopathological analyses and for quantifying fungal load and cytokine levels.

CFU, tissue injury and cytokine profile evaluation

The right lungs and half portions of the livers and spleens were weighed and homogenized in 1 mL sterile PBS by using a tissue homogenizer (Ultra-Turrax T25 Basic; IKA Works, Inc., Wilmington, USA). Colony-forming units (CFU) of *P. brasiliensis* yeast cells were determined as described previously [23, 25]. For determining cytokine levels, the organ homogenates were centrifuged at $5,000 \times g$ for 10 minutes and their supernatants were stored at -20°C .

The left lungs and approximately half portions of the livers and spleens were fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 hours and were embedded in paraffin. Next, the tissue sections (thickness, 5 μ m) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) by using standard protocols and were analyzed by performing light microscopy with

Axiophot photomicroscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) coupled with JVC TK-1270 camera (Victor Company of Japan Ltd, Tokyo, Japan). Total area of the lung sections and inflammatory infiltrates of *P. brasiliensis* yeasts per lung section were measured using a computer-aided image analysis software (ImageJ 1.37v; National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Concentrations of IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10, IL-12, and TGF- β in the lung homogenates were measured by performing capture ELISA with OptEIA ELISA sets (BD PharMingen, San Diego, USA), according to the manufacturer's protocol. Cytokine concentrations were determined by referring to a standard curve for serial two-fold dilutions of recombinant murine cytokines.

Statistical analysis

Statistical differences among means of different experimental groups were determined using one-way analysis of variance followed by Bonferroni's post-test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. All the experiments were performed at least three times.

Results

Isolation and identification of 60 kDa protein isolated from PbAgs

A preparation of PbAgs was affinity chromatographed on an immobilized fetuin column. The bound proteins could not be eluted using carbohydrate solutions (0.4 M D-glucose, D-mannose, D-galactose, or α -lactose). Otherwise, protein elution was achieved by using 1 M NaCl solution in PBS, a fraction containing a 60-kDa major band on SDS-PAGE (Fig 1A) that comprised 68% of all proteins in the sample. The 60-kDa protein band was digested with trypsin and the one dimensional nano-LC-MS/MS analysis of

tryptic fragments revealed that 141 peptides matched the sequence of PbHsp60 (GenBank accession number: XP_010763632.1), resulting in a sequence coverage of 43% (S1 Fig and S1 Table). Because Hsp are protein highly conserved across the species, when we blasted the MS peptide sequences against the *E. coli* database, no correlation with *E. coli* GroEL or other proteins was found. Therefore, this enriched preparation of PbHsp60 was designed nPbHsp60, which was used, as indicated, in subsequent experiments.

Detrimental effects of nPbHsp60 administration to mice with experimental PCM

In initial experiments, we evaluated the effect of nPbHsp60 treatment on the course of experimental PCM in mice. Mice infected with *P. brasiliensis* yeast cells for 3 weeks were injected with nPbHsp60 or control preparations. The nPbHsp60-treated mice showed increased fungal load compared with PBS- or CFA-treated mice (Fig 1B). Treatment with CFA, an efficient inducer of Th1 response in *P. brasiliensis* infection [23], remarkably decreased the CFUs of *P. brasiliensis* yeasts in the lungs compared with treatment with PBS (Fig 1B).

Next, we determined whether the administration of nPbHsp60 changed the beneficial effects of CFA-treatment. Intriguingly, when the *P. brasiliensis*-infected mice were treated with nPbHsp60 (25 µg) emulsified in CFA (nPbHsp60 + CFA), they had numbers of CFU on day 30 after treatment, at least, 2-fold higher than those detected in CFA-treated mice and quite similar to those in the lung from PBS-treated mice (infection control) (Fig 2A). These results indicate that the CFA effect in restraining fungal growth was decreased by nPbHsp60. Moreover, histological analysis showed an extensive lesion area (Fig 2B) with numerous granulomas containing high yeast load (Fig 2E) in the lungs of nPbHsp60 + CFA-treated and negative control mice (Fig 2C).

In contrast, analysis of lung sections of *P. brasiliensis*-infected mice treated with CFA alone showed well-preserved bronchoalveolar architecture, with no detectable granulomas or yeast cells (Fig 2D). Moreover, no granulomas and yeast cells were detected in the livers and spleens of these mice. Together, these results supported the hypothesis that nPbHsp60 treatment impaired the beneficial effect of CFA against PCM.

rPbHsp60 reproduces the nPbHsp60 effects on the experimental PCM course

To validate our presumption that PbHsp60 was responsible for the activities exerted by the fetuin-bound fraction, we expressed rPbHsp60 in pET-28a-*HSP60*-transformed *E. coli* cells and purified it by performing His-Trap chromatography. We analyzed the obtained protein by SDS-PAGE, which produced a single band with apparent molecular mass of 60-kDa. MS analysis confirmed that the recombinant protein was PbHsp60. No correlation with *E. coli* proteins was found when we blasted the MS peptide sequences against the *E. coli* database. This rPbHsp60 was biologically assayed by using the protocols adopted for experiments performed using nPbHsp60. At 51 days post-infection, i.e., 30 days after treatment of the *P. brasiliensis*-infected mice, we compared the fungal load and inflammation in the lungs, liver, and spleen of mice that received rPbHsp60 + CFA as treatment with those treated with CFA or PBS (Fig 3A–C). As expected, CFA treatment decreased the fungal load compared with PBS, whereas rPbHsp60 + CFA duplicated the fungal load the examined organs, indicating that infection dissemination was lower in animals treated with CFA alone and maximum in mice injected with rPbHsp60 + CFA. Consistently, histopathological analysis showed that rPbHsp60 + CFA-injected mice had tissue injury more pronounced than CFA- or PBS-treated mice, an observation that was certified by the morphometric

analysis of granulomatous lesions in the lung, liver, and spleen sections of the infected animals: the lesions occupied areas at least 50% more extended of the organs from rPbHsp60 + CFA-treated mice (Fig 3D–F). Details of the pulmonary histology of the three groups of infected mice can be seen in Fig 3, Panels G-I. The comparative analysis of these panels shows that treatment with rPbHsp60 + CFA resulted in the formation of numerous loose granulomas with inflammation foci and dissemination of yeast cells in the lungs, whereas the CFA-treated mice displayed the most compact and well-structured granulomas (Fig 3H).

rPbHsp60 administration increases the production of cytokines in the lungs of *P.*

brasiliensis infected mice

We next investigated whether increased fungal load and pulmonary lesions in rPbHsp60 alone or rPbHsp60 + CFA-treated mice were associated with an unfavorable pattern of cytokine production in the lungs. Compared with CFA- or PBS-treated mice, the lungs of rPbHsp60 alone or rPbHsp60 + CFA-injected mice showed higher concentrations of different cytokines, including those of inflammatory (IL-17 and TNF- α), Th1 (IL-12 and IFN- γ), Th2 (IL-4), and regulatory (IL-10 and TGF- β) profiles (Fig 4). Notably, the most remarkable increase concerned the concentrations of proinflammatory cytokines IL-17, TNF- α , and IFN- γ , a condition that was consistent with severe inflammation and high fungal load observed in the lungs of rPbHsp60-treated mice (Fig 4).

Discussion

To find components of *P. brasiliensis* yeasts that might affect the outcome of PCM, we isolated an enriched fraction of PbHsp60, which had detrimental effects when

administrated to *P. brasiliensis*-infected mice. The recombinant counterpart of PbHsp60 was prepared and administered to infected mice and reproduced the detrimental effects of the native preparation. In both cases, the treatment resulted in increased fungal load and disseminated disease, as well as in severe pulmonary inflammatory lesions.

Furthermore, nPbHsp60 and rPbHsp60 antagonized the beneficial effects of CFA, a known inducer of Th1 immunity that confers protection against PCM [23]. Detection of high pulmonary concentrations of several cytokines, particularly inflammatory cytokines, suggested that aggravation of PCM resulted from a dysregulated immune response induced by rPbHsp60 administration.

Hsps are evolutionarily well-conserved proteins that function as molecular chaperones. Hsps play key roles in cellular homeostasis; participate in protein folding, unfolding, and assembly; and prevent protein aggregation and denaturation [26]. Although existing in basal conditions with their housekeeping functions in the cells, Hsps have their expression upregulated and are also fundamental to cell survival under stress, such as high temperatures, toxins, and oxidative conditions [27]. In dimorphic fungi, including *P. brasiliensis*, Hsps expression is increased during the conidia to yeast transition [28, 29], an event that may be important in the fungal pathogenesis when conidia reach the lungs of hosts [30]. In the characterization studies of Hsp60 from *P. brasiliensis*, the authors showed that this protein was overexpressed during morphological transition [31] and was recognized by sera from humans with PCM [31, 32]. Besides heat shock, host systems exert additional stress by inducing immune response to prevent fungal colonization and tissue invasion, suggesting that Hsps are required for promoting fungal survival within hosts. This also suggests that Hsps are one of the main targets of immune response [33].

Because fungal Hsp60s are immunodominant antigens that trigger strong cellular and humoral immune responses [27, 34, 35], they are interesting therapeutic and vaccinal targets [36]. Soares et al. [37] reported that rPbHsp60 may serve as an efficient vaccine component for treating experimental PCM. The differences between our results and those of Soares et al. [37] may be due to the different infection routes and protocols for the administration of recombinant PbHsp60. While Soares et al. [37] used intranasal infection, we performed intravenous infection, which mimics a disseminated form of the disease and advantageously constitutes a model for preclinical therapeutic trials [38]. Furthermore, we administrated rPbHsp60 in a therapy regimen, whereas Soares et al. [37] adopted a prophylactic regimen. The protocol used in the present study was designed on the basis of a previous study where treatment of *P. brasiliensis*-infected mice with CFA decreased fungal load in up to 2-log and substantially increased the concentrations of protective cytokines [23]. In the present study, treatment of *P. brasiliensis*-infected mice with rPbHsp60 + CFA increased fungal load, number of diffuse granulomas with inflammation foci, and levels of all cytokines in lungs compared with that in *P. brasiliensis*-infected mice treated with CFA alone. Increased concentrations of proinflammatory cytokines (IL-17, TNF- α and IFN- γ) after rPbHsp60 treatment of *P. brasiliensis*-infected mice aggravated PCM, leading to severe inflammation, host tissue damage, impaired granuloma formation, and *P. brasiliensis* dissemination. Although anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β prevent inflammatory damage [39], lack of equilibrium in cytokine concentrations may favor tissue destruction. The risks of dysregulated cytokine production are clearly noted in other diseases, as septic shock syndrome [40, 41], which has a high mortality rate in humans [42]. Though anti-inflammatory cytokines are produced to compensate the high levels inflammatory response in patients with septic shock syndrome, they may be

harmful, leading to cutaneous anergy, reduction of lymphocytes, decreased of monocytes response to cytokine stimulation, as well as decrease of human leukocytes antigens on monocytes [43]. Like in sepsis, an excessive cytokine production was harmful in *P. brasiliensis*-infected mice treated with PbHsp60, since that dysregulation may have been responsible, at the same time, for increased inflammation and tissue damage and decreased protective immune response against to *P. brasiliensis*, increasing the number of yeast in the tissue. Indeed, a fine-tuning between resistance and tolerance may explain the aspects of fungal infection, such as immunopathology and persistence [44].

Our study provides evidences that administered rPbHsp60 accounts for severe lesions in PCM and allows us to propose that PbHsp60 contributes to the fungal pathogenesis. Moreover, results of this study provide a perspective for controlling exacerbated immune responses and for designing new treatment approaches to induce appropriate immune response against deep mycosis.

Acknowledgements

We thank Denise B. Ferraz, Patrícia E. Vendruscolo, Ana Flávia Gembre, and Vani Maria Alves for providing excellent technical assistance.

References

1. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouer SA, Papaiordanou PM, Goveia A, et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(3):390-394.

2. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 2006; 23(1): 65-73.
3. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009;52(2):273-283.
4. Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peracoli MT. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1998;40(3): 125-135.
5. Severo LC, Geyer GR, Londero AT, Porto NS, Rizzon CF. The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 1979;67(2): 115-118.
6. Bethlem EP, Capone D, Maranhao B, Carvalho CR, Wanke B. Paracoccidioidomycosis. *Curr Opin Pulm Med.* 1999;5(5): 319-325.
7. Martinez R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57 Suppl 19:11-20.
8. de Brito T, Franco MF. Granulomatous inflammation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1994;36(2): 185-192.
9. San-Blas G, San-Blas F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia.* 1977;62(2): 77-86.
10. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica.* 2002;18(5): 1441-1454.
11. Robledo MA, Graybill JR, Ahrens J, Restrepo A, Drutz DJ, Robledo M. Host defense against experimental paracoccidioidomycosis. *Am Rev Respir Dis.* 1982;125(5): 563-567.

12. McInturff JE, Modlin RL, Kim J. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol.* 2005;125(1): 1-8.
13. Bonfim CV, Mamoni RL, Blotta MH. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2009;47(7): 722-733.
14. Lopes JD, Moura-Campos MC, Vicentini AP, Gesztesi JL, de-Souza W, Camargo ZP. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz J Med Biol Res.* 1994;27(9): 2309-2313.
15. Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos LR, et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 1994;62(4): 1465-1469.
16. Ribeiro AM, Bocca AL, Amaral AC, Souza AC, Faccioli LH, Coelho-Castelo AA, et al. HSP65 DNA as therapeutic strategy to treat experimental paracoccidioidomycosis. *Vaccine.* 2010;28(6): 1528-1534.
17. Rittner GM, Munoz JE, Marques AF, Nosanchuk JD, Taborda CP, Travassos LR. Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2): e1519. doi: 10.1371/journal.pntd.0001519.
18. Reis BS, Fernandes VC, Martins EM, Serakides R, Goes AM. Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine.* 2008;26(43): 5461-5469.
19. Fernandes VC, Martins EM, Boeloni JN, Coitinho JB, Serakides R, Goes AM. Additive effect of rPb27 immunization and chemotherapy in experimental

- paracoccidioidomycosis. PLoS One. 2011;6(3): e17885. doi: 10.1371/journal.pone.0017885.
20. Fernandes VC, Martins EM, Boeloni JN, Coitinho JB, Serakides R, Goes AM. The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. Microbes Infect. 2011;13(12-13): 1062-1072.
21. Alegre-Maller AC, Mendonca FC, da Silva TA, Oliveira AF, Freitas MS, Hanna ES, et al. Therapeutic administration of recombinant Paracoccin confers protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection: involvement of TLRs. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(12): e3317. doi: 10.1371/journal.pntd.0003317.
22. Calich VL, Purchio A, Paula CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. Mycopathologia. 1979;66(3): 175-177.
23. de Oliveira LL, Coltri KC, Cardoso CR, Roque-Barreira MC, Panunto-Castelo A. T helper 1-inducing adjuvant protects against experimental paracoccidioidomycosis. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(3): e183. doi: 10.1371/journal.pntd.0000183.
24. Alekseeva MG, Mavletova DA, Kolchina NV, Nezametdinova VZ, Danilenko VN. Isolation and purification of recombinant serine/threonine protein kinases of the strain *Bifidobacterium longum* B379M and investigation of their activity. Biochemistry (Mosc). 2015;80(10): 1303-1311.
25. Peracoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques SA, et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. Microbes Infect. 2003;5(5): 413-418.
26. Vabulas RM, Raychaudhuri S, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(12): a004390. doi:10.1101/cshperspect.a004390.

27. Falkowska-Podstawka M, Wernicki A. Heat shock proteins in health and disease. *Pol J Vet Sci.* 2003;6(1): 61-70.
28. Hernandez O, Garcia AM, Almeida AJ, Tamayo D, Gonzalez A, Restrepo A, et al. Gene expression during activation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Yeast.* 2011;28(11): 771-781.
29. Nicola AM, Andrade RV, Dantas AS, Andrade PA, Arraes FB, Fernandes L, et al. The stress responsive and morphologically regulated hsp90 gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. *BMC Microbiol.* 2008;8: 158. doi: 10.1186/1471-2180-8-158.
30. Restrepo A, Cano LE, Gonzalez A. The power of the small: the example of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57 Suppl 19: 5-10.
31. Izacc SM, Gomez FJ, Jesuino RS, Fonseca CA, Felipe MS, Deepe GS, et al. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2001;39(5): 445-455.
32. Cunha DA, Zancope-Oliveira RM, Sueli M, Felipe S, Salem-Izacc SM, Deepe GS, Jr., et al. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(2): 374-377.
33. Kaufmann SH. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today.* 1990;11(4): 129-136.
34. Moingeon P, Almond J, de Wilde M. Therapeutic vaccines against infectious diseases. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(5): 462-471.

35. Zugel U, Kaufmann SH. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(1): 19-39.
36. Bolhassani A, Rafati S. Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 2008;7(8): 1185-1199.
37. Soares RBA, Gomez FJ, de Almeida Soares CM, Deepe GS, Jr. Vaccination with heat shock protein 60 induces a protective immune response against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection. *Infect Immun.* 2008;76(9): 4214-4221.
38. Ueda AK, Franco M, Fabio SA, Prestes FR. Ketoconazole in the treatment of experimental murine paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 1987;98(1): 27-34.
39. Kurokawa CS, Araujo JP, Jr., Soares AM, Sugizaki MF, Peracoli MT. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiol Immunol.* 2007;51(4): 421-428.
40. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420(6917): 885-891.
41. Junger WG, Hoyt DB, Liu FC, Loomis WH, Coimbra R. Immunosuppression after endotoxin shock: the result of multiple anti-inflammatory factors. *J Trauma.* 1996;40(5): 702-709.
42. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med.* 2007;35(5): 1244-1250.
43. Ward NS, Casserly B, Ayala A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med.* 2008;29(4): 617-625, viii.
44. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4): 275-288.

Figures legends

Fig 1. Native PbHsp60 increase fungal load in *P. brasiliensis*-infected mice. (A)

Isolation of nPbHsp60 from *P. brasiliensis* by using a fetuin–agarose column equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). Chromatography was monitored spectrophotometrically at 280 nm. The fraction eluted with 1 M NaCl was concentrated, dialyzed against 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), and analyzed by performing SDS-PAGE with a 12.5% gel. The gel was stained with Coomassie brilliant blue. Migration positions of molecular mass markers are shown on MW in kDa.

(B) Mice injected with 1×10^6 *P. brasiliensis* yeast cells were treated with or without CFA or nPbHsp60 on day 21 postinfection. Lung homogenates were obtained from these mice on day 30 after the treatment and were analyzed for the CFU of *P.*

brasiliensis yeast. Data are expressed as the mean \pm standard deviation of five mice per group; * $P < 0.05$ compared to the other groups.

Fig 2. Native PbHsp60 reverse the beneficial effect of CFA on experimental PCM.

Mice injected with 1×10^6 *P. brasiliensis* yeast cells were treated with PBS, CFA, or CFA-emulsified nPbHsp60 (nPbHsp60 + CFA) on day 21 postinfection. (A) Lung homogenates were obtained from these mice on day 30 after the treatment and were analyzed for the CFU of *P. brasiliensis* yeast cells. (B–E) Lung tissues obtained on day 30 after the treatment were fixed in formalin, embedded in paraffin, cut into 5- μ m sections, stained with H&E, and analyzed by light microscopy. Scale bars indicate 200 μ m. (B) Morphometric analyses were performed using lung sections obtained from *P. brasiliensis*-infected mice treated with (C) PBS, (D) CFA, or (E) nPbHsp60 + CFA.

Percentage lesion area was measured using a computer-aided image analysis software. Data are expressed as mean \pm standard deviation; ND, not detected; * $P < 0.05$ compared with the other groups.

Fig 3. Recombinant PbHsp60 disrupts the beneficial effect of CFA on experimental PCM. Mice inoculated with 1×10^6 *P. brasiliensis* yeast cells were treated, on day 21 postinfection, with PBS, CFA, or CFA emulsified rPbHsp60 (rPbHsp60 + CFA; 50 μ g). Thirty days after the treatment animals were sacrificed and lung (A), liver (B), and spleen (C) homogenates were analyzed for the CFU of *P. brasiliensis* yeast cells. Data are expressed as the mean \pm standard deviation of five mice per group obtained from three independent experiments. Sections (5- μ m) of these organs were stained with H&E and microscopically analyzed for the extension of granulomatous lesions using Image J software (panels D-F). Bars represent the mean \pm standard deviation of percentage lesion areas; * $P < 0.05$ compared with the other groups. Panels G to I show representative images captured from the pulmonary tissue of mice of each experimental group: PBS-treated (G), CFA (H) and rPbHsp60 + CFA (I). Scale bars of the lung sections indicate 1 mm. Images in the bottom panel correspond to black squares indicated on the upper panels.

Fig 4. Treatment of *P. brasiliensis*-infected mice with rPbHsp60 emulsified or not in CFA increases the concentration of all the tested cytokines. Mice injected with 1×10^6 *P. brasiliensis* yeast cells were treated with **PBS**, **CFA**, rPbHsp60 alone (**rPbHsp60**) or emulsified in CFA (**PbHsp60 + CFA**) on day 21 postinfection. Lung homogenates obtained from these mice on day 30 after the treatment were analyzed for the concentrations of (A) IL-12, (B) IFN- γ , (C) TNF- α , (D) IL-17, (E) IL-4, (F) IL-10,

and (G) TGF- β . Data are expressed as the mean \pm standard deviation of five mice per group obtained from three independent experiments; * $P < 0.05$ compared with the other groups.

Supplementary Figures legends

S1 Fig 1. MS/MS Mascot search data of the 60-kDa protein from *P. brasiliensis*.

The 60-kDa band from *P. brasiliensis* was excised from the electrophoresis gel and digested *in situ* with trypsin. Peptides were extracted from gel and dried, resuspended in 50 μ l 1% formic acid, centrifuged and transferred to HPLC vial. Spectrometry analyses were performed on an Agilent 6520 Q-TOF mass spectrometer equipped with an Agilent 1200 series liquid chromatograph and an Agilent Chip Cube LC-MS interface (1D nLC-MS-MS). Mascot (version 2.3; Matrix, United Kingdom) analysis was performed to identify peptides and to search for proteins in the NCBI nonredundant (nr) database.

S1 Table. List of all proteins matched with at least one peptide with a significant score.

Figure 1.

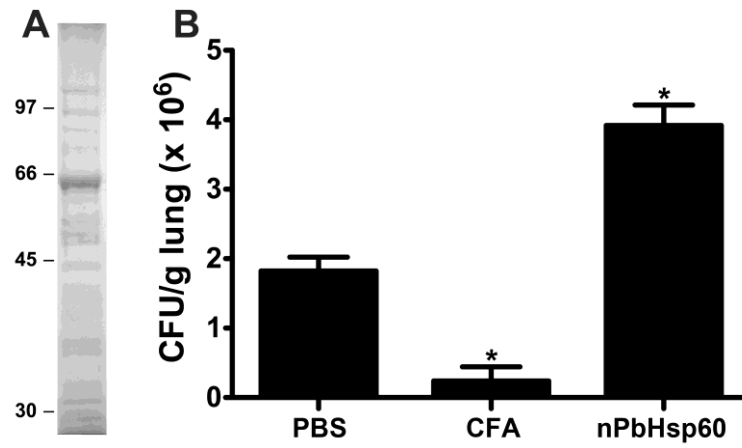


Figure 2.

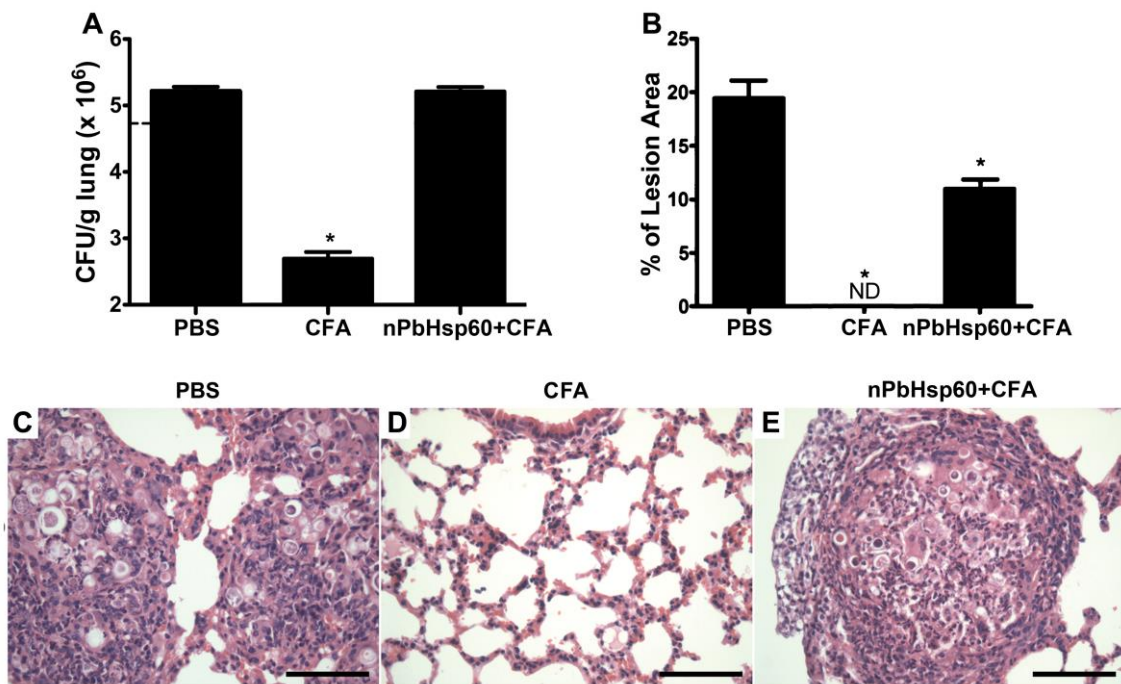
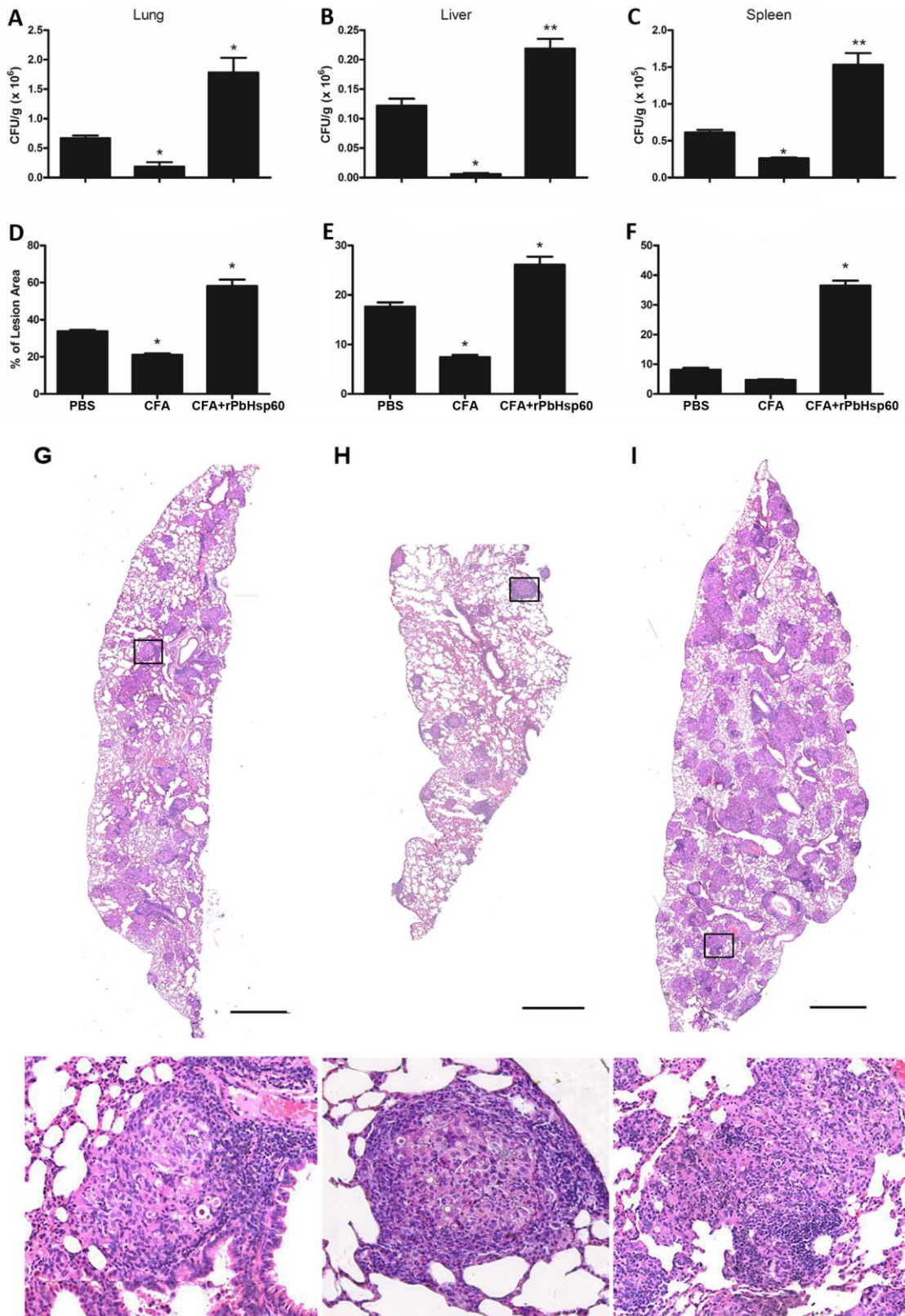


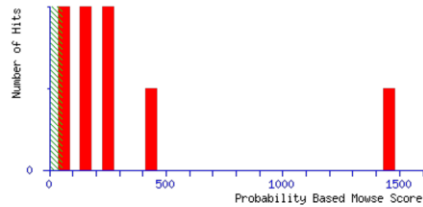
Figure 3.



S1 Figure


Mascot Search Results
Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 54 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

**Peptide Summary Report**

Format As	Peptide Summary	Help
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits
Standard scoring	<input checked="" type="radio"/> MudPIT scoring <input type="radio"/> Ions score or expect cut-off	54
Show pop-ups	<input checked="" type="radio"/> Suppress pop-ups <input type="radio"/> Sort unassigned	Decreasing Score
		Require bold red <input checked="" type="checkbox"/>
Select All	Select None	Search Selected
	<input type="checkbox"/> Error tolerant	Archive Report

Protein hits : [gi|226287931](#) heat shock protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]
[gi|7331218](#) keratin 1 [Homo sapiens]
[gi|281341811](#) hypothetical protein PANDA_012419 [Ailuropoda melanoleuca]
[gi|230338](#) Chain E, Structure Of The Trypsin-Binding Domain Of Bowman-Birk Type Protease Inhibitor
[gi|28317](#) unnamed protein product [Homo sapiens]
[gi|225681092](#) retrograde regulation protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]
[gi|576017](#) Chain E, Crystal Structures Of Rat Anionic Trypsin Complexed With The Protein Inhibitors Appi And Bpti

S1 Table. List of all proteins matched with at least one peptide with a significant score.

Accession	Description	Mass (Da)	Score	Query match	Coverage (%)
XP_010763632.1	heat shock protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	62,522	1457	141	43
AAF60327.1	keratin 1 [Homo sapiens]	66,149	409	10	13
EFB17395.1	hypothetical protein PANDA_012419 [Ailuropoda melanoleuca]	39,324	254	5	16
1TAB_E	Chain E, Structure Of The Trypsin-Binding Domain Of Bowman-Birk Type protease Inhibitor	23,975	207	13	23
CAA32649.1	unnamed protein product [Homo sapiens]	59,720	136	2	4
EEH19376.2	retrograde regulation protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	62,712	129	3	4
1BRB_E	Chain E, Crystal Structures Of Rat Anionic Trypsin Complexed With The Protein Inhibitors Appi And Bpti	24,467	63	1	5