UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

Daiane Fernanda dos Santos

**Atividades *in vitro* e *in vivo* de microesferas
biodegradáveis contendo leucotrieno B₄ e/ou antígenos
livres de células de *Histoplasma capsulatum***

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

Daiane Fernanda dos Santos

**Atividades *in vitro* e *in vivo* de microesferas
biodegradáveis contendo leucotrieno B₄ e/ou antígenos
livres de células de *Histoplasma capsulatum***

Ribeirão Preto

2010

DAIANE FERNANDA DOS SANTOS

**Atividades *in vitro* e *in vivo* de microesferas biodegradáveis
contendo leucotrieno B₄ e/ou antígenos livres de células de
*Histoplasma capsulatum***

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências, pelo curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli.

Ribeirão Preto

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Daiane Fernanda dos

Atividades *in vitro* e *in vivo* de microesferas biodegradáveis contendo leucotrieno B₄ e/ou antígenos livres de células de *Histoplasma capsulatum*. Ribeirão Preto, 2010.

101 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena.

1. Histoplasmose. 2. Microesferas Biodegradáveis. 3. Leucotrieno B₄.
4. Imunomodulação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SANTOS, Daiane Fernanda dos

Título: Atividades *in vitro* e *in vivo* de microesferas biodegradáveis contendo leucotrieno B₄ e/ou antígenos livres de células de *Histoplasma capsulatum*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____. Instituição: _____

Julgamento: _____. Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____. Instituição: _____

Julgamento: _____. Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____. Instituição: _____

Julgamento: _____. Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses (LIIP), do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da Universidade de São Paulo (USP) com apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP – USP (FAEPA);
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP;
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

***Dedico esta dissertação aos meus pais
Benedito e Sueli e à minha irmã Débora
pelo apoio, confiança e compreensão em
todos os momentos.***

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e à minha família, que sempre contribuiu para minha formação, e conseqüentemente, para a realização deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, pelo incentivo, confiança, amizade, compreensão, conhecimentos científicos e oportunidades concedidas.

Ao Prof. Dr. Roberto Nicolete (Beto), pela dedicação e excelente contribuição para realização deste trabalho. Agradeço pela paciência e aprendizado, e sobretudo, pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo, pelas críticas, sugestões, conhecimentos científicos, incentivo, além de sua amizade.

Aos colegas do Laboratório Inflamação e Imunologia das Parasitoses (LIIP), pela agradável convivência, amizade e pelo auxílio, direta ou indiretamente, nos experimentos: Adriana, Ana Carolina, Bárbara, Bruna, Bruno, Camila, Cláudia, Elyara, Fabiani, Franciele, Francisco, Guilherme, Karina, Lívia, Marcela, Milena, Priscilla e Rômulo. Em especial, agradeço à Cláudia e Priscilla, pelas sugestões, discussões e colaboração nos experimentos executados neste trabalho, e além disso, pela amizade e carinho. E obrigada também aos alunos do Prof. Auro: Ciro, Denise, Isabela, Luciana e Marina.

Aos funcionários do LIIP, Érika Vitaliano Garcia de Souza e Carlos Artério Sorgi, pela amizade, aprendizado e colaboração técnica nos experimentos. Também quero agradecer à Fabiana Rosseto de Moraes, pelo auxílio na análise de dados gerados nos experimentos empregando citometria

de fluxo e pela sua amizade.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela manutenção dos animais e auxílio técnico.

À Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato, pela oportunidade de estágio, durante a graduação, junto ao seu grupo de pesquisa, no qual aprendi muitas técnicas e conceitos, e sobretudo, comecei a entrar em contato com a pós-graduação. Agradeço aos colegas de laboratório durante o estágio: Ana Flávia, Cássia, Denise, Lívia, Luís Henrique (Beraba), Marina, Paola, Pryscilla e Rubens (Rubinho). E sobretudo, obrigada “Bera” pela sua paciência, dedicação ao ensinar e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva, pela disponibilização do seu laboratório para confecção das microesferas. A sua aluna Patrícia (Paty), pelas críticas, sugestões, aprendizado e colaboração em experimentos envolvendo cultura de macrófagos e citometria de fluxo, contribuindo, dessa forma, para a realização deste trabalho. Obrigada Paty pelo carinho! E também agradeço ao Kaká, Rodrigo, Rogério e a Wendy e a suas funcionárias Ana Paula Massom, Izaíra Tincani Brandão e Sheila Batista Severino, pela disposição e colaboração técnica.

À Dra. Ana Paula Trombone, pelas sugestões e discussões envolvendo experimentos com as microesferas no início deste trabalho.

À Profa. Dra. Cláudia Maffei, pela cepa de *Histoplasma capsulatum* cedida para a execução deste trabalho, bem como a sua funcionária Elizabete Rosa (Bete), pelo apoio técnico e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, José Orestes Del Ciampo e Henrique Diniz, pela

disponibilização do laboratório para liofilização e análise de alguns parâmetros envolvidos na caracterização das microesferas, e pela disposição técnica.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes e sua aluna Tania Petta, pela disponibilização de equipamento para emprego da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) envolvida em alguns experimentos deste trabalho, bem como do auxílio na análise dos dados.

À Profa. Dra. Maria Célia Jamur e a aluna Patrícia Buranello, pela importante colaboração nos experimentos envolvendo imunofluorescência e microscopia confocal. Também agradeço a aluna Claudia Marchini pela disponibilidade e empenho para aquisição das imagens confocais.

À funcionária do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Ana Cristina M. Polizzelo, pelo auxílio na realização da técnica de eletroforese.

Ao funcionário do Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura, Rodrigo Silva, pelo auxílio técnico.

Ao funcionário do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal da Faculdade de Medicina, Lenaldo Branco Rocha, pela colaboração técnica.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman pela disponibilização de seu laboratório para a realização das etapas de lavagem das microesferas durante sua confecção.

À secretária da Pós-graduação, Ana Cristine Silva Ferreira, pela sua dedicação e competência durante todo este período, bem como, ao Coordenador da Pós-graduação, Prof. Dr. João Santana da Silva, e aos demais professores do Programa pela dedicação e incentivo aos pós-graduandos ao

longo destes anos.

A todos os meus colegas da Pós-graduação, pela amizade e agradável convivência. Em especial, agradeço aos meus amigos Ana Elisa (flor!) e Breno (amore!) pelo apoio e carinho.

Às amigas de faculdade Aline Tronto, Eliane, Gisele e Lidiane pelo carinho, confiança e incentivo, e sobretudo, pela amizade.

Ao Prof. Ms. Rubens Ferracini Junior, durante os tempos de graduação e iniciação científica, pela oportunidade, incentivo à pesquisa, aprendizado científico e também pelo carinho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

***“Só é útil o conhecimento
que nos torna melhores”.
(Sócrates)***

Resumo

RESUMO

Santos, Daiane Fernanda dos - **Atividades *in vitro* e *in vivo* de microesferas biodegradáveis contendo leucotrieno B₄ e/ou antígenos livres de células de *Histoplasma capsulatum*.** 2010. 101p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O *Histoplasma capsulatum* é um fungo dimórfico responsável por infecções pulmonares caracterizadas por reação granulomatosa. Sua incidência vem aumentando nos últimos anos devido principalmente às alterações imunológicas relacionadas ao comprometimento da imunidade celular. Anteriormente, nosso grupo de pesquisa demonstrou o envolvimento dos leucotrienos (LTs) nos mecanismos de defesa do hospedeiro durante a histoplasmose. Além disso, demonstrou que antígenos livres de células (CFAs, do inglês *cell-free antigens*), derivados de *H. capsulatum*, quando empregados na imunização de animais, conferem proteção eficiente aos mesmos e controle da infecção, uma vez que ativam a imunidade celular, e aumento da produção de LTs nos pulmões dos animais imunizados. Assim, nosso grupo desenvolveu microesferas (MS) biodegradáveis, constituídas de ésteres derivados dos ácidos láctico e glicólico (PLGA), contendo LTB₄. Estas MS foram avidamente fagocitadas por macrófagos *in vitro* e aumentaram o recrutamento de leucócitos para os pulmões, quando administradas intratraquealmente. Diante do papel dos LTs na histoplasmose e dos potenciais terapêutico e profilático dos CFAs, o objetivo deste estudo foi avaliar as atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de MS contendo LTB₄ e/ou CFAs. Assim, foram desenvolvidas MS (PLGA) contendo LTB₄ e/ou CFAs através do processo de simples ou dupla emulsão seguido pela extração do solvente. Este método permitiu uma eficiente encapsulação tanto do mediador lipídico quanto dos antígenos protéicos e um perfil de liberação sustentada ao longo dos dias avaliados. O potencial zeta e a morfologia das MS não foram alterados com o processo de microencapsulação; da mesma forma, a integridade dos CFAs não foi interferida. Para estudos *in vitro*, empregamos macrófagos diferenciados de medula óssea murina (BMDMφ). O tamanho adequado das MS contribuiu para sua eficiente fagocitose pelos BMDMφ e as MS contendo LTB₄ e/ou CFAs modularam a produção de TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-12, quimiocinas (KC, MCP-1 e RANTES), e nitrito, sendo que as MS-CFAs mostraram-se mais potentes. O estímulo com as diferentes MS induziu discreto aumento na expressão de CD86 na superfície de BMDMφ. Neste contexto, verificamos o envolvimento do fator de transcrição NF-κB durante a ativação de BMDMφ induzida pelas MS. Apesar da eficiente ativação dos BMDMφ induzida pelas MS, não foi possível evidenciar uma resposta imune celular em animais imunizados com as MS-LTB₄+CFAs ou MS-CFAs. Portanto, futuros experimentos deverão ser realizados a fim de investigar o potencial profilático das MS contendo LTB₄ e/ou CFAs na histoplasmose.

Palavras-chave: Histoplasmose; Microesferas Biodegradáveis; Leucotrieno B₄; Imunomodulação.

Abstract

ABSTRACT

Santos, Daiane Fernanda dos - ***In vitro* and *in vivo* activities of biodegradable microspheres containing leukotriene B₄ and/or cell-free antigens from *Histoplasma capsulatum***. 2010. 101p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Histoplasma capsulatum is a dimorphic pathogenic fungus that causes a pulmonary disease characterized by chronic granulomatous reaction. In the last years, the incidence of histoplasmosis has increased, mainly as a result of the immunological alterations involved with deficiency of the cellular immunity. Previously, our research group demonstrated the involvement of leukotrienes (LTs) on host defense mechanisms during the histoplasmosis. Cell-free antigens (CFAs) derived from *H. capsulatum*, when employed for animals' immunization, can confer efficient protection and control of the infection, since they activate the cellular immunity. Furthermore, the protection of CFAs-immunized mice was associated with increased LTB₄ generation in the lungs. Based on these results, our group developed biodegradable microspheres (MS) based on PLGA containing LTB₄. We showed that these MS were phagocytosed by macrophages *in vitro* and increased the leukocyte recruitment into the lungs, when administrated via intratracheal. Because the role of leukotrienes in the histoplasmosis and therapeutic and profilactic effects of CFAs, the aim of this study was evaluate the *in vitro* and *in vivo* biological activities of MS containing LTB₄ and/or CFAs. Then, MS (PLGA) containing LTB₄ and/or CFAs were developed through simple or double emulsion/extraction process. This method allowed an efficient encapsulation of the lipid mediator and CFAs, and a sustained release profile during the evaluated days. Zeta potential and morphology of MS were not altered with the microencapsulation process; CFAs integrity was not interfered. For *in vitro* studies, we employed bone marrow-derived macrophages (BMDM ϕ). The appropriate size of MS contributed for efficient uptake by BMDM ϕ . MS containing LTB₄ and/or CFAs modulated the TNF- α , IL-1, IL-6 and IL-12, chemokines (KC, MCP-1 and RANTES), and nitrite production by BMDM ϕ , since the MS-CFAs showed potent immunostimulant effect. Moreover, the stimulus with different MS provoked a discreet increase in the CD86 cell expression. Also we verified an involvement of the transcription factor NF- κ B during the BMDM ϕ activation induced by MS. Even though the *in vitro* biological activities on BMDM ϕ , it was not possible to evidence a cellular immune response in immunized mice with the MS-LTB₄+CFAs or MS-CFAs. Therefore, future experiments should be conducted in order to investigate the profilactic potential of MS containing LTB₄ and/or CFAs in the histoplasmosis.

Keywords: Histoplasmosis; Biodegradable Microspheres; Leukotriene B₄; Immunomodulation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – ácido araquidônico

APC – célula apresentadora de antígeno

BHI – meio de cultura com infusão de coração e cérebro

BLTs – receptores de ligação de leucotrienos

BMDM ϕ - macrófagos diferenciados de medula óssea murina

BSA – albumina de soro bovino

CFAs – antígenos livres de células

CFSE – “5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester”

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

cPLA₂ – fosfolipase A₂ citosólica

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole, 2 HCl

ELISA – ensaio imunoenzimático

HSP – proteína de choque térmico

IF – índice fagocítico

IFN- γ - interferon gama

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

IL1-R – receptor de interleucina 1

IP-10 – proteína induzida por IFN- γ

KC – quimiocina derivada de queratinócito

5-LO – 5-lipoxigenase

5-LO^{-/-} - animais que não possuem o gene funcional (“knockout”) da enzima 5-lipoxigenase

LPS – lipopolissacarídeo

LTs/LTB₄ – leucotrieno(s) B₄

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos tipo-1

MHC – complexo principal de histocompatibilidade

MIF – mediana de intensidade de fluorescência

MIP-1 α - proteína inflamatória de macrófagos tipo-1 alfa

MS – microesferas

NF- κ B – fator de transcrição nuclear kappa-B

NO – óxido nítrico

PBS – salina tamponada com fosfato

PLGA – ácido poli (d,l)-lático co-glicólico

PPAR- α - “peroxisome proliferator-activated receptor”

PVA – polivinil álcool

RANTES – “regulated on activation normal T-cell expressed and secreted”

SBF – soro bovino fetal

SDS-PAGE – “sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis”

SEM – erro padrão da média

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

Th1 – T “helper” 1

TLR – receptor do tipo *Toll*

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da obtenção de microesferas pelos métodos de simples ou dupla emulsão seguida pela evaporação/extração do solvente	14
Figura 2 – Distribuição de diâmetros obtidos para as microesferas	25
Figura 3 – Distribuição de potencial zeta obtido para as microesferas	27
Figura 4 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura das microesferas	29
Figura 5 – Curva de calibração padrão de LTB ₄	30
Figura 6 – Cromatogramas do LTB ₄ proveniente das microesferas	31
Figura 7 – Liberação acumulada <i>in vitro</i> de LTB ₄ e/ou CFAs das microesferas	34
Figura 8 – SDS-PAGE dos CFAs em forma de solução e obtidos das MS ..	37
Figura 9 – Gráficos representativos da expressão de F4/80 na superfície de BMDM ϕ e viabilidade celular	39
Figura 10 – Fagocitose das microesferas pelos BMDM ϕ	41
Figura 11 – Fotomicrografias de BMDM ϕ que fagocitaram as microesferas ..	42
Figura 12 – Imagens confocais de BMDM ϕ que fagocitaram microesferas fluorescentes	43

Figura 13 – Produção de TNF- α por BMDM ϕ incubados com as microesferas durante 4h e 18, 24 e 48 h	44
Figura 14 – Produção de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12p40/p70 e IL-10 por BMDM ϕ incubados com as microesferas durante 24 h	46
Figura 15 – Produção de KC, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 por BMDM ϕ incubados com as microesferas durante 24 h.....	48
Figura 16 – Produção de nitrito por BMDM ϕ estimulados com as microesferas durante 24 h	49
Figura 17 – Expressão de CD86 na superfície de BMDM ϕ incubados com as microesferas durante 18 h	51
Figura 18 – Imunofluorescência para NF- κ B em BMDM ϕ incubados com as microesferas durante 4h	53
Figura 19 – Proliferação de linfócitos obtidos de animais imunizados com as microesferas e reestimulados <i>ex vivo</i> durante 3 dias	57
Figura 20 – Produção de IFN- γ pelos linfócitos obtidos de animais imunizados com as microesferas e reestimulados <i>ex vivo</i> durante 3 dias	58
Figura 21 - Proliferação de linfócitos obtidos de animais imunizados com as microesferas e reestimulados <i>ex vivo</i> durante 3 dias	59

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de abreviaturas e siglas	iii
Lista de figuras	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Mediador lipídico leucotrieno B ₄	12
3.2 Obtenção e cultivo de <i>H. capsulatum</i>	12
3.3 Antígenos livres de células de <i>H. capsulatum</i> (CFAs)	12
3.4 Microesferas biodegradáveis (MS)	13
3.5 Caracterização das microesferas biodegradáveis	14
3.5.1 Análise de tamanho, potencial zeta e morfologia.....	14
3.5.2 Eficiência de encapsulação	15
3.5.3 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	16
3.5.4 Avaliação da integridade dos CFAs extraídos das microesferas	17
3.6 Animais	17
3.7 Obtenção de macrófagos diferenciados a partir da medula óssea (BMDM ϕ)	17
3.8 Ensaio de fagocitose das microesferas pelos BMDM ϕ	18
3.9 Avaliação de fagocitose das microesferas por microscopia confocal	19
3.10 Determinação da concentração de citocinas e quimiocinas por ELISA em sobrenadante de cultura de BMDM ϕ estimulados com microesferas	19
3.11 Determinação da concentração de nitrito pela reação de Griess em sobrenadante de cultura de BMDM ϕ estimulados com microesferas	20
3.12 Avaliação do fenótipo de BMDM ϕ após estimulação com microesferas	20
3.13 Avaliação da ativação de fator de transcrição NF- κ B em BMDM ϕ estimulados com as microesferas	20

3.14 Imunização de camundongos com microesferas	21
3.15 Ensaio de proliferação de linfócitos e determinação da concentração de IFN- γ	22
3.16 Análises estatísticas	23
4. RESULTADOS	24
Parte I – Caracterização de microesferas biodegradáveis	24
Parte II – Atividades biológicas de microesferas sobre BMDM ϕ <i>in vitro</i>	38
Parte III – Atividades biológicas de microesferas <i>in vivo</i>	57
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	86

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histoplasmose

A histoplasmose dita clássica é causada pelo *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e foi descrita pela primeira vez pelo patologista americano Samuel Darling no início do século XX. A denominação deste fungo (“histo”) deve-se à observação de organismos dentro de histiócitos (termo antigo dado aos macrófagos), semelhantes a protozoários como *Leishmania* (“plasma”), com uma suposta cápsula circundante (“capsulatum”) (DARLING, 1906). Somente mais tarde verificou-se tratar de uma infecção por fungo não-capsulado (DE MONBREUN, 1934).

O *H. capsulatum* é encontrado em solos ou outros locais contendo excretas contaminadas de aves e morcegos (FERREIRA & BORGES, 2009). Por isso, ocupações e atividades recreativas envolvendo solo, poeira acumulada, grutas e até mesmo construções antigas são importantes fatores de risco para aquisição da doença fúngica, uma vez que proporcionam a exposição a um grande inóculo do fungo (GOMPERTZ *et al.*, 2004; KAUFFMAN, 2007; WOODS, 2002).

O *H. capsulatum* é um fungo dimórfico que se apresenta sob a forma micelial ou filamentosa à temperatura ambiente ou a 22 – 28° C em meios de cultura artificiais. No micélio, dois tipos de conídios são formados: o macroconídio e o microconídio, sendo este o principal propágulo infeccioso devido ao pequeno tamanho (3 a 5 µm). A forma filamentosa é característica da fase saprofítica ou de vida livre deste fungo. Após a inalação de conídios ou fragmentos miceliais (3 a 10 µm), o organismo na fase filamentosa converte-se para a leveduriforme, devido à temperatura do hospedeiro. A conversão também ocorre a 37° C *in vitro*. Esta fase leveduriforme é encontrada principalmente dentro dos macrófagos, nos quais ela sobrevive e se multiplica, caracterizando a fase parasitária do *H. capsulatum* (KUROKAWA *et al.*, 1998; WOODS, 2002; KAUFFMAN, 2007).

A parede celular do *H. capsulatum* é composta por galactomananas, α -

1,3-glucana, β -1,3-glucana, quitina, proteínas e lipídios. Na forma filamentosa há o predomínio de β -1,3-glucana, sendo que na forma de levedura há também a presença de α -1,3-glucana na camada mais externa da parede celular. Durante a transição de micélio-levedura, há um aumento da transcrição de genes relacionados com o ciclo celular e codificadores de proteínas de choque térmico (HSPs). As HSPs estão relacionadas com a termotolerância do fungo a 37° C. (ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2005; KUROKAWA *et al.*, 1998). Então, na fase leveduriforme do *H. capsulatum* ocorre a produção de fatores extracelulares e associados à parede celular (como α -glucana e HSP-60) que estão relacionados à virulência do fungo (HOLBROOK & RAPPLEYE, 2008).

A histoplasmose é uma infecção fúngica bastante comum no mundo. É endêmica nas Américas (Estados Unidos e países das Américas Central e do Sul) e apresenta pequenos focos de incidência em algumas partes da Europa, Ásia e África. Também ocorre, em menor frequência, nas regiões não-endêmicas (WHEAT, 2006; FERREIRA & BORGES, 2009; KAUFFMAN, 2009). No Brasil, esta micose é endêmica em várias regiões e possui uma maior incidência nas regiões sudeste, centro-oeste e norte (FERREIRA & BORGES, 2009). No entanto, a incidência de histoplasmose vem aumentando nos últimos anos, sendo considerada uma das infecções fúngicas sistêmicas e pulmonares mais comuns e clinicamente significativas. Testes intradérmicos com histoplasmina (um antígeno deste fungo) indicam que mais da metade da população de áreas endêmicas adquiriu histoplasmose em algum momento da vida (WHEAT, 2006). As principais manifestações clínicas incluem a infecção assintomática, histoplasmose pulmonar aguda, histoplasmose pulmonar crônica cavitária e histoplasmose disseminada (KAUFFMAN, 2009). Alterações imunológicas (imunossupressão) associadas com a epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), quimioterapia para o câncer, transplante de órgãos e de medula óssea, e doenças autoimunes, têm contribuído para o aumento da incidência desta micose. Sendo assim, a manifestação clínica da doença depende das condições imunes do hospedeiro (comprometimento da imunidade celular), e principalmente, do inóculo infeccioso e da virulência do

fungo (WOODS, 2002).

1.2 Resposta imune na infecção por *H. capsulatum*

Os fagócitos mononucleares têm papel essencial na defesa do hospedeiro contra o *H. capsulatum*. Sua importância já é evidenciada na imunidade inata, na qual contribuem não somente para capturar e destruir o patógeno invasor, mas também para o desenvolvimento da reação inflamatória local. No entanto, o *H. capsulatum*, parasita intracelular, desenvolveu maneiras de evadir-se dos mecanismos microbicidas dos macrófagos. Estes são a inibição da fusão do fagolisossoma (NEWMAN, 1999; WOODS, 2002); modulação do pH no fagolisossoma, quando formado (KUOKAWA *et al.*, 1998); saída do fungo do vacúolo fagocítico para o citoplasma; inibição ou diminuição da geração de óxido nítrico (NO, do inglês “nitric oxide”), do “burst” oxidativo, e da captura de ferro a partir da transferrina (elemento importante para a função microbicida do macrófago (NEWMAN, 1999; WOODS, 2002).

A imunidade mediada por células com participação dos neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e citocinas, principalmente IFN- γ , é o principal mecanismo de controle desta infecção caracterizada pela formação de granulomas, já que muitas leveduras resistem à morte microbicida. Várias citocinas contribuem para a defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *H. capsulatum*. A ausência de TNF- α reduz a síntese de NO que é essencial para o controle da infecção pelo *H. capsulatum* (ALLEENDOERFER & DEEPE Jr, 1998). Deepe Jr e Gibbons (2006) mostraram que a neutralização do TNF- α após a infecção pelo *H. capsulatum* resultou em aumento da carga fúngica e diminuição da sobrevivência dos animais. Além disso, a ausência desta citocina nos animais infectados contribuiu para a redução na geração de células de memória CD62L^{lo} CD44^{hi} nos pulmões dos mesmos.

Para a resistência à infecção pelo *H. capsulatum* também são necessárias a IL-1, uma vez que nos pulmões de animais IL-1R^{-/-} infectados há redução de NO, IFN- γ e células T CD4⁺, e aumento das citocinas IL-4 e IL-10 (DEEPE Jr & MCGUINNESS, 2006). Similarmente, o fator estimulador de

colônia granulócito-macrófago (GM-CSF) endógeno também contribui para a resposta imune protetora na histoplasmose primária (DEEPE Jr *et al.*, 1999). A neutralização de IL-12 em animais infectados, e consequentemente a diminuição da liberação de IFN- γ , altera a natureza da reação inflamatória nos pulmões e a expressão de moléculas coestimuladoras e MHC de classe II envolvidas na imunidade celular protetora (CAIN & DEEPE Jr, 2000). Além disso, IL-17 e IL-23 influenciam a resposta protetora ao fungo, uma vez que durante a infecção aguda ocorre um aumento de IL-17 nos pulmões que é dependente de IL-6 e IL-10. Na ausência de IL-12, a IL-23 é capaz de prolongar a sobrevivência dos animais (DEEPE Jr & GIBBONS, 2009).

Então, citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6, e quimiocinas (MIP-1 α , IP-10, RANTES) promovem o recrutamento leucocitário para o local da infecção, onde macrófagos e linfócitos T ativados circundam o patógeno a fim de conter o seu crescimento e evitar sua disseminação. Sendo assim, para o controle da infecção e geração de imunidade protetora são importantes IL-12 e IFN- γ para o desenvolvimento de uma resposta imune de padrão T “helper” 1 (Th1) (ZHOU *et al.*, 1995; NEWMAN, 1999; DEEPE Jr, 2000; HENINGER *et al.*, 2006).

Além de realizarem a fagocitose, secreção de citocinas e a morte microbiana através da produção de intermediários reativos do oxigênio e NO, os macrófagos funcionam como células apresentadoras de antígeno (APCs) na resposta imune adaptativa mediada por células, e como células efetoras que controlam e matam patógenos intracelulares após ativação por citocinas (NEWMAN, 1999; DEEPE Jr, 2000).

O papel dos anticorpos na defesa do hospedeiro contra o *H. capsulatum* é questionável, uma vez que o fungo é um parasita intracelular. No entanto, anticorpos gerados durante a resposta imune de perfil Th1 podem contribuir para a eliminação do patógeno, a partir da neutralização e opsonização das leveduras e ativação do sistema complemento que culminam, dessa forma, para aumentar a fagocitose e a eliminação do *H. capsulatum* (ROMANI, 2004; CUTLER *et al.*, 2007).

1.3 Papel de leucotrienos na infecção por *H. capsulatum*

Os leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA) pela via da enzima 5-lipoxigenase (5-LO). O AA, presente nos fosfolipídios da membrana celular sob a forma esterificada, é liberado pelas fosfolipases, como a fosfolipase A_2 citosólica (cPLA₂). A cPLA₂ é translocada para membrana em resposta a vários estímulos, como mediadores solúveis e agentes infecciosos que ativam diferentes vias de sinalização intracelular. O AA livre pode ser convertido em LTs pela 5-LO, sendo que esta enzima também é translocada para membrana e ativada pela FLAP (do inglês *five-lipoxygenase-activating protein*). Sob ação da 5-LO, o AA é convertido em ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), que por sua vez, origina o LTA₄. O LTA₄ pode ser transformado em LTB₄ pela ação da LTA₄ hidrolase, ou em LTC₄ pela ação da enzima LTC₄ sintase, que catalisa a conjugação de LTA₄ com glutathione reduzida. LTC₄ é convertido, pela ação da γ -glutamyl transferase, em LTD₄, e este forma LTE₄ pela ação de peptidases. LTC₄, LTD₄ e LTE₄ são denominados cisteinil-leucotrienos (cysLTs) por possuírem resíduo cisteína em comum (PETERS-GOLDEN, 1998; HARIZI & GUALDE, 2004; FLAMAND *et al.*, 2007).

Diferentes tipos celulares são capazes de produzir LTs: mastócitos, basófilos e eosinófilos secretam primariamente cysLTs, neutrófilos e células dendríticas, LTB₄, e macrófagos secretam de forma equilibrada ambas as classes de LTs. Os LTs iniciam seus efeitos através da interação com receptores ligados à proteína G (GPCRs), tais como BLT₁ e BLT₂ para LTB₄, e cysLT₁ e cysLT₂ para cysLTs (PETERS-GOLDEN, 1998).

Os LTs exercem importantes funções na reação inflamatória e na defesa imune contra patógenos. Sabe-se que o LTB₄ é um potente quimioatraente para leucócitos (FORD-HUTCHINSON *et al.*, 1980), além de aumentar a capacidade fagocítica e microbicida dos fagócitos (PETERS-GOLDEN *et al.*, 2004; FLAMAND *et al.*, 2007). O LTB₄ também é capaz de ligar-se a um receptor nuclear denominado PPAR- α (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor*), cuja interação induz a produção de enzimas para a

degradação de ácidos graxos e aumenta o catabolismo do LTB₄, e por isso, está envolvida com o controle da inflamação (DEVCHAND *et al.*, 1996).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o recrutamento de fagócitos e outros leucócitos na infecção por *H. capsulatum* envolve principalmente mediadores lipídicos como os LTs (MEDEIROS *et al.*, 1999). Posteriormente, verificamos que os LTs estão aumentados nos pulmões de animais infectados com *H. capsulatum*, e que a inibição farmacológica destes mediadores, pelo tratamento com o composto MK886, resultou em aumento na recuperação do fungo (unidades formadoras de colônias ou UFC) nos pulmões e baço; exacerbação da reação inflamatória; aumento da produção de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6) e quimiocinas; e diminuição de IFN- γ , IL-12 e NO. Estas alterações resultaram em morte de 100% dos animais. Sugerimos, então, que os LTs são essenciais para eficiente defesa do hospedeiro nesta micose (MEDEIROS *et al.*, 2004). Em estudo subsequente, também demonstramos que os LTs endógenos são essenciais para a fagocitose e atividade microbicida dos macrófagos na histoplasmose (SECATTO *et al.*, em fase de preparação). Em conjunto, nossos dados ressaltam que os LTs são relevantes para a fagocitose, mecanismos microbicidas e resposta imune adaptativa na histoplasmose.

1.4 Antígenos livres de células isolados de *H. capsulatum*

Devido à alta incidência mundial de histoplasmose, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para seu controle e de vacinas para prevenir esta infecção fúngica. Em uma série de estudos, Gomez *et al.* (1991) identificaram imunógenos protetores provenientes do *H. capsulatum* para o desenvolvimento de vacinas. Estes e outros estudos mostraram que o extrato da parede e membrana celulares da fase leveduriforme (isolados protéicos HIS-62 e HIS-80), que são homólogos a proteínas de choque térmico (HSPs) 60 e 70, respectivamente (Gomez *et al.*, 1991, 1992) e o antígeno H recombinante (Deepe Jr. & Durose, 1995; Deepe Jr. & Gibbons, 2001) são antígenos promissores para desenvolvimento de vacinas.

Sá-Nunes *et al.* (2005) mostraram que antígenos livres de células (CFAs, do inglês *cell-free antigens*) provenientes da fase leveduriforme do *H. capsulatum* induziram uma potente resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH, do inglês *delayed-type hypersensitivity*) nos animais infectados com esse fungo e ativaram *in vitro* células específicas para produção de IFN- γ , uma citocina essencial para imunidade protetora. Demonstramos ainda que a imunização com CFAs foi capaz de conferir proteção aos camundongos contra um inóculo letal de *H. capsulatum*, e reduzir a carga fúngica nos pulmões e baço de animais infectados (SÁ-NUNES *et al.*, 2005). Posteriormente mostramos que a proteção de animais imunizados com CFAs foi associada com o aumento na produção de LTB₄, NO e IFN- γ , bem como a geração e recrutamento de células T de memória aos pulmões (MEDEIROS *et al.*, 2008).

1.5 Microesferas biodegradáveis

Os polímeros biodegradáveis podem ser sintéticos ou naturais e se degradam enzimaticamente ou não *in vivo* para produzir subprodutos biocompatíveis ou não-tóxicos (ELDRIDGE *et al.*, 1991; LIMA & RODRIGUES JR, 1999). Estes polímeros têm sido empregados para preparar microesferas (MS) que constituem sistemas de liberação progressiva, de forma controlada ou não, das substâncias dissolvidas ou dispersas no seu interior (SINHA *et al.*, 2003). Dentre os sistemas poliméricos de liberação sustentada/controlada, vêm sendo bastante exploradas as MS constituídas de ésteres derivados dos ácidos láctico e glicólico (PLGA, ácido poli (d,l)-láctico co-glicólico). Este polímero permite a construção de MS, cujo tamanho (não ultrapassando 10 μ m) assegura sua interação com fagócitos (NICOLETE *et al.*, 2007; CHAMPION *et al.*, 2008). Além disso, possui segurança quanto à degradação e estabilidade, e por isto, tem seu uso liberado para humanos (LIMA & RODRIGUES JR, 1999; JONES, 2008).

Como já mencionado, o LTB₄ induz a quimiotaxia de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares), ativa a fagocitose e os

mecanismos microbicidas dos leucócitos, modula a produção de citocinas, exercendo assim um papel protetor em várias infecções. Por isso, os LTs têm potencial terapêutico para tratamento de doenças infecciosas como a histoplasmose. Sendo assim, nós e outros grupos de pesquisa temos sugerido que os LTs podem ser empregados como adjuvantes ou imunomoduladores da resposta imune nas infecções. No entanto, estes mediadores lipídicos são facilmente degradados, via reações de oxidação e hidrólise, perdendo rapidamente suas propriedades biológicas, além de serem pouco solúveis em solução aquosa, dificultando seu uso *in vivo*. Com o objetivo de preservar as atividades biológicas dos LTs para uso *in vivo*, desenvolvemos um sistema de microencapsulação de LTB₄, empregando PLGA. Nossos estudos mostraram que MS biodegradáveis de PLGA, contendo LTB₄, são uma ferramenta eficaz para preservação deste lipídio, e constituem um sistema de liberação sustentada do mediador. As MS contendo LTB₄ foram mais fagocitadas por macrófagos *in vitro* em relação às MS controle, e quando administradas intratraquealmente aumentaram o recrutamento de leucócitos para os pulmões de animais deficientes da produção endógena do mediador (5-LO^{-/-}) (NICOLETE *et al.*, 2007). Além disso, verificamos que as MS contendo LTB₄ induzem alta produção de NO em células endoteliais humanas e em macrófagos peritoneais murinos. Também estas micropartículas induzem o aumento da expressão do receptor nuclear PPAR- α , quando receptores para LTB₄ (BLTs) na superfície de macrófagos peritoneais murinos são bloqueados por antagonistas, evidenciando a liberação do mediador lipídico no interior da célula (NICOLETE *et al.*, 2008). Estes resultados são bastante promissores, pois representam novas possibilidades para o tratamento adjuvante de doenças infecciosas, em especial, a histoplasmose.

As micropartículas poliméricas apresentam efeitos como adjuvantes vacinais, uma vez que possibilitam a liberação controlada e entrega do antígeno a APCs, assim como, a ativação celular com resultante imunidade protetora. O tamanho e a forma das micropartículas também afetam o seu caráter adjuvante (JONES, 2008). Tem sido mostrado que a incorporação de

antígenos em MS é capaz de induzir respostas imunes celular e humoral (LIMA & RODRIGUES JR, 1999). Estudos com toxóide tetânico mostraram que uma única dose de injeção via subcutânea deste antígeno protéico em MS induziu resposta imune eficiente e de longa duração, por mecanismo relacionado ao aumento da proliferação de células T e produção de anticorpos (MEN *et al.*, 1995). Resposta imune humoral de mucosa (mediada pela produção de IgA) também pode ser induzida a partir da administração via intranasal de MS de PLGA modificadas na sua superfície (MS catiônicas), e contendo antígeno recombinante da hepatite B (JAGANATHAN & VYAS, 2006). Também o antígeno de superfície do vírus da hepatite B recombinante (HBsAg) foi eficientemente encapsulado em MS PLGA, e uma única imunização por via subcutânea usando essas preparações, resultou em aumento da produção de anticorpos com títulos comparáveis àqueles obtidos com três doses de preparações convencionais baseadas no adjuvante hidróxido de alumínio (FENG *et al.*, 2006).

Similarmente, Faisal *et al.* (2009) mostraram que a encapsulação de um antígeno proveniente de *Leptospira* em MS foi capaz de conferir melhor proteção à infecção do que a administração do antígeno em hidróxido de alumínio. Além disso, as MS PLGA vêm sendo empregadas na coencapsulação de agonistas de receptores do tipo *Toll* (TLR), tais como oligonucleotídeos CpG (CpG ODN) e antígenos vacinais, a fim de induzir potentes respostas de células T citotóxicas (CTLs) (MALYALA *et al.*, 2009; FISHER *et al.*, 2009; SCHLOSSER *et al.*, 2008).

Neste contexto, consideramos que a associação de CFAs e LTB₄ em MS pode ativar de modo mais eficiente os mecanismos de defesa do hospedeiro, e constituir uma nova preparação vacinal para esta micose. Como até o presente, nada existe descrito utilizando método semelhante, faz-se necessário, inicialmente, estudos para avaliar os efeitos destas preparações sobre os macrófagos que são fagócitos profissionais e células efetoras na resposta imunológica. Desta forma, investigamos se as preparações de MS biodegradáveis de PLGA contendo LTB₄ associado com CFAs de *H.*

capsulatum apresentavam potencial para serem empregadas como formulações vacinais ou terapêuticas na histoplasmose pulmonar murina.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos:

1. O desenvolvimento e a caracterização de microesferas poliméricas biodegradáveis contendo LTB₄ e/ou CFAs de *H. capsulatum*;
2. A avaliação de atividades biológicas (imunomoduladoras) *in vitro* de microesferas biodegradáveis contendo LTB₄ e/ou CFAs sobre macrófagos diferenciados de medula óssea murina;
3. A avaliação da resposta imune celular estimulada pelas microesferas biodegradáveis contendo CFAs ou LTB₄ e CFAs após administração *in vivo* em camundongos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Mediador lipídico leucotrieno B₄

O mediador lipídico LTB₄ foi adquirido da Cayman Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) e dissolvido em solução de etanol absoluto na concentração de 96 µg/mL ou $3,0 \times 10^{-4}$ M para estocagem a – 80° C.

3.2 Obtenção e cultivo de *H. capsulatum*

A cepa selvagem do *H. capsulatum* utilizada foi isolada a partir do sangue de um paciente com diagnóstico confirmado para histoplasmoses acompanhado clinicamente no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A cepa foi mantida na forma filamentosa, à temperatura ambiente (25° C), em Ágar Dextrose Sabouraud (Difco). Para obtenção de leveduras, esta forma foi convertida através do cultivo a 37° C, em meio BHI-ágar (Difco) acrescido de 5% de sangue de carneiro. Alíquotas desta amostra foram submetidas ao teste de viabilidade com diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (CALICH *et al.*, 1979). As amostras foram utilizadas somente quando a viabilidade do fungo foi superior a 90 %. Todos os experimentos envolvendo *H. capsulatum* foram realizados em laboratório equipado de biossegurança nível 3.

3.3 Antígenos livres de células de *H. capsulatum* (CFAs)

Aproximadamente 300 mg da fase leveduriforme de *H. capsulatum*, cultivada em meio BHI-ágar (Difco) acrescido de sangue, foram coletados e ressuspensos em 1 mL de PBS, homogeneizados por 60 segundos em um vórtex-mixer e centrifugados a 10.000 x g por 60 segundos. O sobrenadante foi coletado e o procedimento repetido. Então, este material depois de filtrado, teve seu conteúdo protéico estimado usando o Kit “Coomassie Protein Assay Reagent” (Pierce), e curvas-padrão de albumina de soro bovino (BSA) preparadas de acordo com as instruções do fabricante (CAMARGO *et al.*, 1991; SÁ-NUNES *et al.*, 2005).

3.4 Microesferas biodegradáveis (MS)

Microesferas (MS) contendo LTB₄ ou controle (sem LTB₄) foram preparadas usando o método de simples emulsão óleo-em-água seguido do processo de extração/evaporação do solvente (Figura 1). Para uma fase orgânica interna, 0,3 mL de LTB₄ ($3,0 \times 10^{-5}$ M) dissolvido em etanol foi adicionado a 10 mL de diclorometano (J. T. Baker, USA) contendo 120 mg de PLGA 50:50 (Resomer RG 505, MM 78Kda – Boehringer Ingelheim-Ingelheim, Alemanha). Em seguida, esta fase foi colocada numa fase aquosa externa contendo surfactante (25 mL de solução de polivinil álcool a 3% - PVA) (Sigma Aldrich Chemicals) e misturada mecanicamente usando um homogeneizador (RW20: IKA) a 600 rpm por 4 horas para extração do solvente orgânico. Após isso, as MS foram lavadas três vezes com água deionizada estéril, e então, liofilizadas e armazenadas a - 20° C (NICOLETE *et al.*, 2007).

Microesferas contendo ou não CFAGs de *H. capsulatum* (MS-CFAGs) foram obtidas a partir do método de múltipla emulsão água-óleo-água seguido do processo de eliminação do solvente (Figura 1) (LIMA *et al.*, 2003; TROMBONE *et al.*, 2007). Primeiramente, 10 mL de diclorometano contendo 120 mg de PLGA 50:50 foram emulsificados ou não (MS controle) com 0,3 mL de CFAGs (100 µg/mL) usando um homogeneizador (T25 Ultraturrax: IKA) por 4 minutos para produzir uma emulsão primária água-em-óleo. Esta emulsão foi misturada mecanicamente (RW20: IKA) com 25 mL de PVA a 3% (surfactante). A partir daí, os procedimentos até obtenção das MS liofilizadas foram os mesmos descritos anteriormente. As MS contendo LTB₄ e CFAGs (MS-LTB₄+CFAGs) foram preparadas através do método de múltipla emulsão água-óleo-água seguido do processo de extração do solvente, conforme descrito (Figura 1).

Para os ensaios de fluorescência, foram preparadas MS fluorescentes marcadas com corante fluorescente verde (6-cumarina; Sigma Aldrich Chemicals), a fim de confirmar a fagocitose das MS pelos macrófagos através de microscopia confocal. Microesferas fluorescentes foram preparadas a partir da adição de 6-cumarina à fase orgânica. A quantidade de 6-cumarina/mg de

polímero foi 0,15 μg (TROMBONE *et al.*, 2007).

As MS foram avaliadas quanto ao seu tamanho, potencial zeta, morfologia, eficiência de encapsulação do LTB₄ e/ou CFAs e liberação de tais substâncias *in vitro*. Também foram submetidas ao teste para detecção de endotoxina, empregando o ensaio “*Limulus Amebocyte Lysate*” (NICOLETE *et al.*, 2007).

Figura 1. Representação esquemática da obtenção de microesferas pelos métodos de simples ou dupla emulsão seguida pela evaporação/extração do solvente.

3.5 Caracterização das microesferas biodegradáveis

3.5.1 Análise de tamanho, potencial zeta e morfologia

O diâmetro das micropartículas foi caracterizado usando um analisador de tamanho de partícula (LS 13 320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer;

Beckman Coulter, USA). As micropartículas liofilizadas foram dispersas em água deionizada e submetidas à análise. Resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão do tamanho (diâmetro) da partícula.

A análise de potencial zeta foi realizada usando um Nano Zeta Sizer (Malvern instruments, Inglaterra). Para esta análise, as MS liofilizadas também foram dispersas em água deionizada. O polímero PLGA (50:50), constituído de ésteres derivados de ácidos láctico e glicólico, possui residual de carga elétrica negativa. Assim, a análise de potencial zeta das partículas foi realizada a fim de verificar se a encapsulação de substâncias de natureza protéica (CFAGs) alteraria o residual de carga elétrica, tornando a superfície da partícula mais negativa, e com isso, dificultando sua interação com a célula, uma vez que a membrana plasmática é de polaridade negativa.

A forma e a superfície das MS liofilizadas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (ZEISS, Evo 50, Cambridge, Inglaterra). As micropartículas foram dispersas em etanol e mantidas no ultrassom por 3 minutos, exceto as MS contendo CFAGs ou LTB₄ e CFAGs. Em seguida, as partículas foram dispostas sobre porta-amostras (“stubs”) contendo fita adesiva isolante. Foi feito o seu recobrimento com ouro por 90 segundos e sob corrente elétrica de 40 mA. E finalmente, tais amostras foram submetidas à análise microscópica em alto vácuo (1×10^{-5} Torr) e com uma tensão de 15-20 kV.

3.5.2 Eficiência de encapsulação

A taxa de encapsulação de LTB₄ foi feita através da dissolução do polímero (10 mg MS) com 0,2 mL do solvente orgânico acetonitrila. Após evaporação do solvente através de um concentrador de amostras (“speed vacuum”), foram adicionados 0,1 mL de solução PBS/etanol absoluto (vol./vol.) à amostra. Então, a quantificação de LTB₄ foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (“Liquid Chromatograph”, HP series 1090), sendo que sua absorbância máxima é de 270 nm. O tempo de retenção do LTB₄ foi de aproximadamente 13,5 minutos. A fase móvel consistiu em um gradiente de água deionizada e metanol (tempo 0 min: 40 % metanol,

tempo 8 min: 70 % metanol, tempo 9 min: 100 % metanol, tempo 17 min: 100 % metanol). Para a fase reversa foi usada a coluna apolar C18 (Supelco Park, Bellefonte, PA, USA), cujo comprimento é de 25 cm e o diâmetro do poro é 5 μm . A curva-padrão do LTB₄ (triplicata) consistiu nas seguintes concentrações: 1,25 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$.

A taxa de encapsulação de CFAGs foi determinada após adição de 0,6 mL de solvente orgânico acetonitrila em 10 mg de MS. A amostra foi mantida em vórtex até sua completa homogeneização e após isso foi adicionado 2 mL de água destilada. A amostra foi centrifugada a 5.000 x *g* por 5 minutos e submetida a um período de evaporação do solvente (“overnight”). E então, uma alíquota da fase aquosa foi separada para análise. Este procedimento foi adotado uma vez que concentrações de acetonitrila acima de 10 % podem interferir positivamente no ensaio usando reagente Coomassie, conforme instruções do fabricante. A quantificação dos CFAGs foi avaliada usando reagente Coomassie com curvas-padrão de CFAGs (50 $\mu\text{g/mL}$ a 1 $\mu\text{g/mL}$). Então, as amostras (0,15 mL) foram incubadas com reagente Coomassie (0,15 mL) por 30 segundos, sob agitação, e posteriormente, permaneceram por 10 min à temperatura ambiente. A concentração protéica foi determinada a 595 nm usando um leitor de ELISA (960, Metertech).

3.5.3 Estudo de liberação *in vitro*

MS contendo LTB₄ e/ou CFAGs (10 mg) foram ressuspensas em 1 mL de PBS/etanol absoluto (vol./vol.) ou somente PBS pH 7,4 e incubadas a 37° C sob agitação constante a 150 rpm. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, durante 14 dias, amostras de sobrenadante (0,4 mL) foram coletadas e centrifugadas (10.000 x *g*, 5 minutos). Um volume igual de solução tampão foi repostado. A concentração de LTB₄ foi determinada através de CLAE e as proteínas no sobrenadante foram quantificadas através do reagente Coomassie com curvas-padrão de CFAGs.

3.5.4 Avaliação da integridade dos CFAs extraídos das microesferas

A fim de confirmar a integridade dos CFAs após o processo de microencapsulação, a integridade dos CFAs extraídos das MS foi avaliada através de eletroforese (SDS-PAGE, do inglês *sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*). As MS contendo CFAs foram dissolvidas em 0,6 mL de acetonitrila e os CFAs foram extraídos com 2 mL de água deionizada através de leve agitação e centrifugação a 5.000 x *g* por 5 minutos. As fases aquosas foram concentradas através de “speed vacuum”. Para análise SDS-PAGE, as amostras dos CFAs nativos e dos antígenos protéicos extraídos das MS contendo CFAs foram suspensas em Tris-HCl, glicerol, SDS e mercaptoetanol, aplicadas em gel de empilhamento a 5 % e submetidas à eletroforese em gel de separação a 12 % (SÁ-NUNES *et al.*, 2005). Após a corrida, (10 mA e 200 V), o gel foi submetido à coloração por nitrato de prata. Proteínas com massa molecular conhecida (MM) foram usadas como padrões.

3.6 Animais

Foram utilizados camundongos (15 – 22 g) de linhagens 129 e C57BL/6 criados no Biotério II, livre de patógenos específicos (SPF, do inglês *specific pathogen free*), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sob condições adequadas e com livre acesso à água e alimento. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Prefeitura do Campus Administrativo de Ribeirão Preto (PCARP), da Universidade de São Paulo (protocolo n. 08.1.382.53.0).

3.7 Obtenção de macrófagos diferenciados a partir de medula óssea (BMDM ϕ)

Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM ϕ) foram preparados a partir da tíbia e fêmur de camundongos sv129. Células precursoras (1,0 x 10⁶/poço) existentes na medula óssea das duas patas foram cultivadas durante 7 dias em placas de cultura (24 poços) de baixa aderência (“non-tissue culture

treated plate”, Beckton Dickson) com 1 mL de meio: 50% de RPMI-1640 (RPMI-I), 20% de soro bovino fetal (SBF), 30% de sobrenadante de cultura L-929 (clone 929 de linhagem L, ATCC:CCL1, fonte de M-CSF/CSF-1) e antibióticos (10 µL/mL de penicilina/estreptomicina e 1 µL/mL de gentamicina). No 4º dia, ou quando necessário, foi adicionado 1,0 mL deste meio completo (RACOOSIN *et al.*, 1989; AUDRAN *et al.*, 2003). Ao final da diferenciação, as células foram removidas com PBS gelado, sendo que uma parte foi destinada à análise por citometria de fluxo, quanto à expressão da molécula de superfície F4/80 a fim de caracterizar o fenótipo de macrófagos (AUSTYN & GORDON, 1981). Os BMDMφ também foram submetidos ao teste de viabilidade pela exclusão com azul de Tripán e pela marcação com Anexina-V conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC)/Iodeto de Propídio. Após essa caracterização, as demais células foram adicionadas em placas de 24 poços (1,0 x 10⁶/mL por poço). A suspensão contendo macrófagos foi incubada “overnight” em estufa úmida a 37° C, 5% CO₂, para aderência das células.

3.8 Ensaio de fagocitose das microesferas pelos BMDMφ

Após incubação, as células não-aderentes foram removidas e o macrófagos aderidos foram co-incubados por 4h com 1 mg/mL por poço de microesferas contendo LTB₄ e/ou CFAs de *H. capsulatum*. Microesferas sem incorporação das moléculas ou somente meio RPMI foram usados como controles. Após 4h, o meio foi aspirado e as microesferas não fagocitadas foram removidas por três lavagens com PBS. Solução de tripsina a 0,25 % foi adicionada para remoção das MS aderidas à membrana celular. Os macrófagos aderidos foram coletados após lavagem de duas a três vezes com PBS gelado. Após citocentrifugação e coloração panótica, determinamos a porcentagem de células com no mínimo uma microesfera fagocitada, e também, a capacidade fagocítica dos macrófagos, através do cálculo do índice fagocítico (IF). O índice fagocítico foi calculado assim: IF = número de MS fagocitadas multiplicado pelo número de macrófagos que fagocitaram no mínimo uma MS, e o resultado foi dividido pelo total de macrófagos contados.

3.9 Avaliação de fagocitose das microesferas por microscopia confocal

A fim de confirmar a presença das MS no interior da célula fagocítica, foi avaliada a fagocitose das MS através de microscopia confocal. BMDM ϕ (5×10^5 células/poço) foram plaqueados em poços contendo lamínulas e coincubados com 1 mg/mL de MS fluorescentes (MS marcada com 7-cumarina) durante 4 horas. Após esta incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas por 15 minutos com PBS contendo 2% de paraformaldeído e lavadas com PBS. Lâminas foram montadas usando Acqua Poly/Mount (Polysciences) e examinadas por microscopia confocal (Leica TCS SP2 AOBS – Leitz, Mannheim, Alemanha).

3.10 Determinação da concentração de citocinas e quimiocinas por ELISA em sobrenadante de cultura de BMDM ϕ estimulados com microesferas

Macrófagos foram estimulados com 1 mg/mL por poço de microesferas controle ou contendo LTB $_4$ e/ou CFAGs de *H. capsulatum*, ou com LTB $_4$ ($3,0 \times 10^{-8}$ M) e CFAGs (50 μ g/mL) não encapsulados. Meio RPMI e LPS (0,5 μ g/mL) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Após 24h de estimulação, os sobrenadantes de cultura foram coletados e destinados à detecção de citocinas, quimiocinas e nitrito. Os macrófagos foram removidos para análise fenotípica por citometria de fluxo como descrito a seguir. As citocinas e quimiocinas foram quantificadas de acordo com instruções do fabricante empregando o método de ELISA (ensaio imunoenzimático). As citocinas TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-12p40/p70, IL-10 e quimiocinas KC, CCL2 (MCP-1) e CCL5 (RANTES) foram detectadas empregando anticorpos de captura, citocinas-padrão e anticorpos biotinilados e amplificados com estreptoavidina-peroxidase de acordo com instruções do fabricante (OptEIATM, BD Biosciences – para citocinas; DuoSet, R&D Systems – para quimiocinas). Como substrato foi utilizado o-Phenylenediamine (OPD) ou tetrametilbenzidina (TMB) e a reação foi bloqueada adicionando ácido sulfúrico (H $_2$ SO $_4$ 1M) aos

poços. A leitura das amostras foi feita em filtro de 490 nm.

3.11 Determinação da concentração de nitrito pela reação de Griess em sobrenadante de cultura de BMDM ϕ estimulados com microesferas

Os sobrenadantes de cultura de macrófagos foram coletados e armazenados até o momento da dosagem a -20° C. A detecção de óxido nítrico (NO) foi avaliada indiretamente pela quantificação de nitrito (NO $_2^-$) através do método de Griess (GREEN *et al.*, 1981) e determinada por espectrofotometria utilizando filtro de 540 nm. Foram utilizados os seguintes reagentes para essa reação: sulfanilamida 1%, di-hidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1%, H $_3$ PO $_4$ 2,5% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA).

3.12 Avaliação do fenótipo de BMDM ϕ após estimulação com microesferas

Macrófagos foram estimulados com diferentes MS ou estímulos na forma de solução (LTB $_4$ ou CFAs não encapsulados) conforme descrito anteriormente. Após 18 e 24 h de estimulação, os macrófagos foram removidos, lavados com PBS e distribuídos em tubos para citometria previamente identificados. Foram pré-incubados com anti-CD16/CD32 (Fc Block) por 40 minutos à temperatura ambiente, em seguida, tais células foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro, com anticorpos marcados com fluorocromos: anti-CD86 (anticorpos para moléculas coestimuladoras B7-2). Após isso, as células foram lavadas com PBS a 2% SBF e finalmente ressuspensas em PBS com 1% de formaldeído para análise por citometria de fluxo.

3.13 Avaliação da ativação de fator de transcrição NF- κ B em BMDM ϕ estimulados com as microesferas

A fim de verificar o envolvimento do fator de transcrição NF- κ B na ativação de BMDM ϕ estimulados com as MS, tais células (1×10^5 células/poço) foram plaqueadas em poços contendo lamínulas e coincubadas com 1 mg/mL

por poço de microesferas controle ou contendo LTB₄ e/ou CFAGs de *H. capsulatum*, ou com LTB₄ ($3,0 \times 10^{-8}$ M) e CFAGs (50 µg/mL) não encapsulados. Meio RPMI e LPS (0,5 µg/mL) foram os controles. Após 4h de estimulação, os sobrenadantes de cultura foram removidos e a translocação de NF-κB para o núcleo foi avaliada por imunofluorescência como descrita a seguir.

Após o tempo de estímulo, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas por 15 minutos com PBS contendo 2% de paraformaldeído, e posteriormente, foi feita a lavagem com PBS contendo glicina a 0,1 M por 5 minutos. A partir disso, iniciou-se a permeabilização com PBS contendo 0,01 % de saponina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) por 20 minutos. Em seguida, após lavagem com PBS, realizou-se o bloqueio com PBS contendo 3 % de soro normal de jumento (Jackson ImmunoResearch Laboratories), durante 40 minutos à temperatura ambiente, a fim de impedir a ligação inespecífica de anticorpos em receptores FcγR dos macrófagos. Os BMDMφ foram incubados durante 1 hora com anticorpos policlonais de coelho, cuja especificidade é para subunidade p65 do fator de transcrição NF-κB (Santa Cruz Biotechnology). Em seguida, foi feita a lavagem com PBS e foram adicionados anticorpos secundários (IgG de jumento) anti-IgG de coelho conjugados com Alexa-Fluor 594 (Invitrogen Molecular Probes) por 30 minutos. Além disso, foi feita marcação para o núcleo celular usando 4',6-diamidino-2-phenylindole, 2 HCl (DAPI; Calbiochem) durante 15 minutos. Após a imunomarcação, as lâminas foram montadas usando Acqua Poly/Mount (Polysciences) e examinadas por microscopia confocal (Leica TCS SP5 AOBS – Leitz, Mannheim, Alemanha).

3.14 Imunização de camundongos com microesferas

Antígenos livres de células obtidos de *H. capsulatum* (CFAGs) foram emulsificados em adjuvante de Freund completo (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) v/v na concentração final de 200 µg/mL. Camundongos da linhagem C57BL/6, com 6 a 8 semanas, foram divididos em diferentes grupos

experimentais, nos quais foram injetados via subcutânea 50 µg/250 µL de CFAs emulsificados, 20 mg/250 µL de MS controle, MS-CFAs ou MS-LTB₄+CFAs. Uma semana após a primeira dose, os animais receberam a mesma quantidade de CFAs emulsificados em adjuvante de Freund incompleto (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) e a mesma quantidade de MS. Após 2 semanas, os camundongos receberam um desafio (“booster”) via intravenosa de uma preparação de CFAs 5 µg/0,1 mL. Um grupo controle (não imune) não recebeu nenhuma dose, exceto o desafio com CFAs ao final do período de imunização.

3.15 Ensaio de proliferação de linfócitos e determinação da concentração de IFN-γ

Linfócitos foram obtidos a partir de baço de camundongos imunizados após 3 dias do desafio intravenoso. O baço foi removido, eritrócitos foram lisados e esplenócitos foram plaqueados e incubados por uma hora em estufa a 37° C. As células não-aderentes, isto é, os linfócitos foram coletados e marcados com CFSE (do inglês *5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*; Invitrogen), lavados 3 vezes, enumerados e ressuspensos para quantidade desejada. Os BMDMφ foram usados como células apresentadoras de antígenos (APCs) na quantidade de 1 x 10⁵/ poço num volume de 500 µL (placa de 48 poços). Após incubação “overnight”, as APCs foram estimuladas com CFAs solúvel (50 µg/mL) ou MS (1 mg/mL) por 24h. A partir daí, foi feita a cocultura com linfócitos na proporção de 10:1 (1 x 10⁶/ poço) durante 3 dias. Como controle positivo de proliferação, os linfócitos foram estimulados com anticorpos purificados de ascite anti-CD3ε (1 µg/mL) e anti-CD28 (2 µg/mL) (hibridomas 145.2 C11 e PV-1, respectivamente, ATCC gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Auro Nomizo). Após esse tempo, os linfócitos foram analisados por citometria de fluxo quanto ao conteúdo de CFSE e expressão de marcadores CD4 e CD8 em sua superfície, a fim de caracterizar o fenótipo dos linfócitos que proliferaram. Tais procedimentos

foram adaptados a partir dos trabalhos de MEN *et al.*, 1999; STIER *et al.*, 2004; MA *et al.*, 2007. Também foi feita a detecção de citocina (IFN- γ) por ELISA a partir do sobrenadante desta cocultura.

3.16 Análises estatísticas

O teste t não pareado foi utilizado para todas as análises através do Software InStat. A significância estatística foi considerada para valores de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

PARTE I - Caracterização de microesferas biodegradáveis

4.1.1 Análise de tamanho, potencial zeta e morfologia

As MS de ácidos láctico e glicólico (PLGA 50:50) liofilizadas foram dispersas em água deionizada e submetidas à análise da distribuição de tamanho através do método da difratometria a laser. A Figura 2 A-D mostra a distribuição do diâmetro das micropartículas. O diâmetro médio em 50% das MS controle (sem mediador lipídico e CFAs) foi de 6,62 μm , enquanto que para as MS-LTB₄, foi de 3,81 μm . As MS-CFAs e MS-LTB₄+CFAs (50% das amostras) apresentaram as seguintes médias de diâmetro: 7,62 μm e 9,19 μm , respectivamente. A coencapsulação de CFAs e LTB₄ em MS aumentou o diâmetro das micropartículas, quando comparado às MS controle ou contendo somente o mediador lipídico ou os antígenos protéicos. Com isso, foi possível verificar que as diferentes preparações de MS apresentaram médias de diâmetros variando de 4,0 a 9,0 μm , todos menores que 10 μm .

Figura 2A. Distribuição de tamanho de MS controle. Média de diâmetro: 6,65 $\pm$ 3,88 μm ; d_{50} : 6,62 μm (< 1 μm : 6,49 %, < 10 μm : 78,6 %, < 100 μm : 100 %, < 1000 μm : 100 %).

Figura 2B. Distribuição de tamanho de MS-LTB₄. Média de diâmetro: 4,18 $\pm$ 2,38 μm ; d_{50} : 3,81 μm (< 1 μm : 4,78 %, < 10 μm : 98,6 %, < 100 μm : 100 %, < 1000 μm : 100 %).

Figura 2C. Distribuição de tamanho de MS-CFAGs. Média de diâmetro: $7,63 \pm 3,74 \mu\text{m}$; d_{50} : $7,62 \mu\text{m}$ ($< 1 \mu\text{m}$: 5,10 %, $< 10 \mu\text{m}$: 72,4 %, $< 100 \mu\text{m}$: 100 %, $< 1000 \mu\text{m}$: 100 %).

Figura 2D. Distribuição de tamanho de MS-LTB₄+CFAGs. Média de diâmetro:

$9,17 \pm 3,88 \mu\text{m}$; d_{50} : $9,19 \mu\text{m}$ ($< 1 \mu\text{m}$: 3,92 %, $< 10 \mu\text{m}$: 56,7 %, $< 100 \mu\text{m}$: 100 %, $< 1000 \mu\text{m}$: 100 %).

As MS liofilizadas foram dispersas em água deionizada e submetidas à análise de potencial zeta. Os gráficos 3 A-D mostram a distribuição de potencial zeta das MS. Foi possível verificar que não houve diferenças relevantes na média de potencial zeta das MS controle (- 29,9 mV), MS-LTB₄ (- 15,5 mV), MS-CFAGs (- 23,9 mV) e MS-LTB₄+CFAGs (- 24,4 mV). Portanto, a

encapsulação de antígenos protéicos e/ou LTB₄ não resultou em alterações de carga elétrica na superfície do polímero.

Figura 3A. Distribuição de potencial zeta de MS controle. Média de potencial zeta: $-29,9 \pm 7,26$ mV.

Figura 3B. Distribuição de potencial zeta de MS-LTB₄. Média de potencial zeta: $-15,5 \pm 9,28$ mV.

Figura 3C. Distribuição de potencial zeta de MS-CFAs. Média de potencial zeta: $-23,9 \pm 6,24$ mV.

Figura 3D. Distribuição de potencial zeta de MS-LTB₄+CFAs. Média de potencial zeta: $-24,4 \pm 6,24$ mV.

A forma e superfície das MS liofilizadas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura. A encapsulação de LTB₄ e/ou CFAs não causou alterações na forma e superfície das micropartículas, uma vez que as MS apresentaram forma esférica e superfície lisa (Figura 4 A-D). Algumas das

micropartículas apresentaram certa deformação, possivelmente devido à alta tensão elétrica utilizada na aquisição das imagens nos maiores aumentos.

Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura das MS controle (A), MS-LTB₄ (B), MS-CFAs (C) e MS-LTB₄+CFAs (D).

Para verificar se as MS poderiam conter endotoxina (LPS), o teste “*Limulus Ameobocyte Lysate*” (LAL), cuja sensibilidade é de 0,1 a 1,0 unidade de endotoxina (UE)/mL, foi realizado. A quantidade de endotoxina foi menor que 0,1 UE/µg de microesfera. Segundo a Farmacopéia Européia, uma quantidade segura para administração endovenosa é 5,0 UE/kg/hora que corresponde a 0,1 UE por camundongo (20 g) por hora.

4.1.2 Eficiência de encapsulação

A taxa de encapsulação de LTB₄ foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Micropartículas contendo LTB₄, com ou sem a incorporação de CFAGs, foram dissolvidas em solvente orgânico acetonitrila e submetidas à quantificação do mediador lipídico encapsulado. A partir da curva-padrão de LTB₄ (Figura 5) foi possível determinar a concentração de LTB₄ de cada amostra. A seguinte fórmula foi utilizada para os cálculos: $f(x) = 81,9587.x - 18,0938$, na qual $f(x)$ equivale à área e x , a concentração de LTB₄ (µg/mL).

Figura 5. Curva-padrão de LTB₄ (1,25 – 100 µg/mL); $R^2 = 0,9999$. Valores detectados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A seguir, são mostrados os cromatogramas do LTB₄ recuperado das MS-LTB₄ e MS-LTB₄+CFAs (Figuras 6A e B, respectivamente).

Figura 6. Cromatogramas do LTB₄ recuperado das MS-LTB₄ (A) e MS-LTB₄+CFAs (B), a fim de determinar a sua taxa de encapsulação em MS. Cada amostra foi analisada por CLAE, conforme descrito no item 3.5.2., sendo que os tempos de retenção do LTB₄ foi 14,45 min (A) e 14,50 min (B). Os valores da quantidade encapsulada foram 0,37 µg/mL e 0,35 µg/mL, respectivamente.

MS-LTB ₄ : área = 12,2158	→	0,37 µg/mL de LTB ₄
MS-LTB ₄ +CFAGs: área = 10,6423	→	0,35 µg/mL de LTB ₄

Conforme descrito em material e métodos (item 3.4), foram adicionados 9,6 µg/mL de LTB₄ em 120 mg de PLGA 50:50 para o preparo das micropartículas. Sendo assim, a concentração teórica do mediador lipídico em 10 mg de micropartícula é 0,8 µg/mL, que representa 100% de eficiência de encapsulação. Com base nessa condição, foi obtida uma taxa de encapsulação de 46,25% (MS-LTB₄) e 43,88% (MS-LTB₄+CFAGs).

MS-LTB ₄ : 10 mg = 0,37 µg/mL	→	46,25 %
MS-LTB ₄ +CFAGs: 10 mg = 0,35 µg/mL	→	43,88 %

A eficiência de encapsulação de CFAGs foi determinada por Coomassie conforme descrito no item 3.5.2. A incorporação de 100 µg/mL de CFAGs em 120 mg de PLGA 50:50 representa uma quantidade teórica de 8,33 µg/mL (10 mg de MS) e 100% de eficiência de encapsulação. Após quantificação, foi obtida a concentração de 0,37 µg/mL de CFAGs/mg de MS, para a preparação de MS-CFAGs, e 0,45 µg/mL, para a preparação de MS-LTB₄+CFAGs, que mostra uma eficiência de encapsulação de 44,30% e 54,14%, respectivamente.

MS-CFAGs: 10 mg = 3,69 µg/mL	→	44,30 %
MS-LTB ₄ +CFAGs: 10 mg = 4,51 µg/mL	→	54,14 %

4.1.3 Estudo de liberação *in vitro*

A cinética de liberação *in vitro* do LTB₄ e/ou CFAGs provenientes de MS PLGA foi avaliada durante 14 dias (336 h). A Figura 7 A-C mostra as liberações acumulativas do mediador e/ou antígenos encapsulados. Nas MS-CFAGs,

verificamos que ocorreu um efeito “burst” de liberação, no qual a liberação dos antígenos atingiu aproximadamente 50 % da quantidade encapsulada após 4 h. O efeito “burst” é geralmente atribuído à rápida difusão da substância adsorvida na superfície das MS (Giteau *et al.*, 2008). Este fenômeno foi seguido por liberação contínua e lenta a partir de 4 h, sendo que até o final da cinética (336 h) foi identificada a liberação de 55 % do antígeno (Figura 7B).

Em relação às MS-LTB₄+CFAs (Figura 7C), houve liberação de 56 % do mediador lipídico no tempo 0 h e de 70 % dos antígenos protéicos encapsulados em 2 h. A partir disso, verificou-se um perfil de liberação constante ao longo dos tempos avaliados. Efeito “burst” também ocorreu para o LTB₄ proveniente da preparação contendo apenas este mediador, uma vez que 92 % foram liberados no tempo 0 h. A liberação acumulada mostrou-se constante até 336 h (Figura 7A).

Figura 7. Cinética de liberação acumulada *in vitro* do LTB₄ das MS-LTB₄ (A), CFAs das MS-CFAs (B), LTB₄ (vermelho) e CFAs (azul) das MS-LTB₄+CFAs (C). MS contendo LTB₄ e/ou CFAs foram ressuspensas em PBS/etanol absoluto (vol./vol.) ou somente PBS pH 7,4 e incubadas a 37° C sob agitação constante durante 14 dias. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, amostras foram coletadas para análise, conforme descrito no item 3.5.3.

4.1.4 Avaliação da integridade dos CFAGs extraídos das microesferas

O efeito do processo de microencapsulação pelo método de extração do solvente sobre a integridade estrutural dos CFAGs foi investigada usando SDS-PAGE. Amostras de CFAGs na forma de solução e de CFAGs extraídos das MS foram submetidas à corrida eletroforética seguida de coloração por nitrato de prata. Proteínas com massa molecular conhecida (MM) foram usadas como padrões. A fim de calcular a massa molecular das bandas de interesse, foi calculada a mobilidade eletroforética relativa (R_f) das bandas de massa molecular conhecida através da seguinte fórmula: $R_f = \text{distância percorrida (cm)} / \text{ponto de referência (gel total, cm)}$. Então foi feita a correlação entre o R_f do padrão molecular e seu respectivo log da massa molecular, através do software GraphPad InStat. O R_f das bandas protéicas de massa desconhecida (CFAGs na forma de solução e extraído das MS) foi calculado e inserido neste programa estatístico, e com isso, foram obtidas as massas moleculares das bandas de interesse.

Massa molecular padrão (kDa)	R_f	log massa molecular (log M)
196,143	0,032	2,292572814
131,064	0,0635	2,117483418
90,555	0,127	1,956912435
42,076	0,317	1,624034446
31,931	0,429	1,50421252
17,218	0,667	1,235982703
6,890	0,762	0,838219221

Determinação da massa molecular das bandas referentes aos CFAGs na

forma de solução, sendo que $\log M = x \Rightarrow 10^x = M$:

Rf	Log M	M (kDa)
0,143	1,998	99,54
0,159	1,973	93,33
0,190	1,919	82,99
0,222	1,864	73,11
0,254	1,808	64,27
0,333	1,671	46,88
0,413	1,532	34,04
0,667	1,091	12,33
0,683	1,063	11,56
0,698	1,037	10,89
0,714	1,009	10,21
0,730	0,982	9,594

Determinação das massas moleculares dos CFAGs extraídos das MS:

Banda 1:

$$R_f = 0,175 \longrightarrow \log M_1 = 1,946$$

$$10^{1,946} = M_1$$

$$\mathbf{M_1 = 88,31 \text{ kDa}}$$

Banda 2:

$$R_f = 0,222 \longrightarrow \log M_2 = 1,865$$

$$10^{1,865} = M_2$$

$$\mathbf{M_2 = 73,28 \text{ kDa}}$$

A integridade de antígenos protéicos de interesse recuperados das preparações foi preservada. A análise por SDS-PAGE permitiu detectar duas bandas de proteínas com massa molecular de 88,31 kDa e 73,28 kDa (Figura 8), sendo que uma delas tem sido descrita como potencial imunógeno (Gomez *et al.*, 1991,1992).

Figura 8. CFAs liberados das MS preservam integridade. SDS-PAGE dos CFAs (coluna A) e CFAs obtidos das MS (coluna B) com gel de poliacrilamida a 12% corado por nitrato de prata. Marcadores MM (kDa) são mostrados à esquerda do gel.

PARTE II – Atividades biológicas de microesferas sobre BMDM ϕ *in vitro*

4.2.1 Fenótipo e viabilidade dos macrófagos diferenciados a partir da medula óssea

Após a caracterização das MS, foram iniciados os ensaios para avaliação das atividades biológicas das diferentes micropartículas sobre macrófagos murinos. Os macrófagos foram obtidos a partir da diferenciação de precursores existentes na medula óssea, como descrito na metodologia (item 3.7). Ao final da diferenciação, foi feita a análise fenotípica dos macrófagos quanto à expressão de F4/80 (AUSTYN & GORDON, 1981) na sua superfície por citometria de fluxo. Também foi avaliada a viabilidade celular através do método de exclusão, utilizando o corante azul de tripan, e marcação para anexina-V FITC/iodeto de propídio - PI (ensaio de apoptose através de citometria de fluxo).

As análises fenotípicas mostraram que 75,3 % das células diferenciadas da medula óssea expressavam F4/80 na sua superfície (Figura 9A). Quanto à viabilidade celular através do azul de tripan, verificamos que 92 % das células estavam viáveis. O ensaio de apoptose permitiu constatar que 84 % das células eram negativas para Anexina-V/FITC e PI, ou seja, viáveis (Figura 9B).

Figura 9. Expressão de F4/80 na superfície dos BMDM ϕ (A) e viabilidade celular determinada por marcação Anexina-V FITC/PI (B) através de citometria de fluxo. A *gate* (P1) dos macrófagos foi feita de acordo com o tamanho (*forward angle light scatter*/FSC) e granulosidade (*side light scatter*/SSC). A população P1 foi analisada quanto ao número de macrófagos positivos para F4/80 (P2)(A). Q3 representa a porcentagem de células viáveis (Anexina-V/PI⁻) (B).

4.2.2 Fagocitose das microesferas por BMDM ϕ

Primeiramente, foi realizada uma cinética de fagocitose que consistiu na incubação dos BMDM ϕ com as diferentes MS durante 2, 4, 6, 8 e 24 h, a 37° C.

O objetivo da cinética foi verificar o tempo ideal para a captura das MS pelos macrófagos. Avaliando a porcentagem de células que ingeriu no mínimo uma MS, foi verificado que após 4 h não houve diferenças significativas quanto ao número de células que fizeram fagocitose (dados não mostrados). Sendo assim, o tempo de 4 h foi utilizado para a avaliação da fagocitose das MS.

BMDM ϕ foram incubados com MS controle, MS contendo LTB₄ e/ou CFAGs durante 4 h a 37° C. A fagocitose das micropartículas foi avaliada através da porcentagem de células que ingeriu no mínimo uma MS e do índice fagocítico. Os resultados mostraram um maior número de macrófagos que ingeriram no mínimo uma MS-LTB₄ ($49,71 \pm 5,19$ %), MS-CFAGs ($61,83 \pm 13,73$ %) e MS-LTB₄+CFAGs ($70,2 \pm 13,5$ %) em comparação à MS controle ($31,83 \pm 9,89$ %) (Figura 10A). BMDM ϕ apresentaram um maior índice fagocítico quando incubados com MS-LTB₄ ($57,74 \pm 16,63$), MS-CFAGs ($137,85 \pm 101,75$) e MS-LTB₄+CFAGs ($191,29 \pm 110,28$) em relação à MS controle ($23,84 \pm 12,66$) (Figura 10B).

Figura 10. Porcentagem de células que fagocitaram no mínimo uma MS após 4 h de incubação (A) e índice fagocítico (IF = número de MS fagocitadas x número de BMDM ϕ contendo no mínimo uma MS/número total de BMDM ϕ) (B). Os resultados são expressos como média $\pm$ S.E.M.; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em relação aos valores obtidos com BMDM ϕ incubados com MS controle (teste t não pareado).

Não ocorreu a fagocitose das MS pelos BMDM ϕ quando incubados a 4° C, uma vez que esta condição inibe o processo de fagocitose (dados não mostrados). Fotomicrografias referentes à fagocitose das diferentes MS pelos BMDM ϕ a 37° C, após 4 h de incubação, são mostradas na figura 11A-D.

Figura 11. Fotomicrografias de BMDM ϕ que ingeriram MS controle (A), MS-LTB₄ (B), MS-CFAGs (C) e MS-LTB₄+CFAGs (D), respectivamente. As células foram identificadas por coloração panótica e visualizadas por microscopia de campo claro. Aumento de 1.000X. As setas mostram as micropartículas fagocitadas.

A presença de MS no interior dos BMDM ϕ foi também avaliada e confirmada por microscopia confocal. BMDM ϕ foram incubados com as diferentes MS fluorescentes (marcadas com cumarina como descrito na metodologia, item 3.9) durante 4h a 37° C (Figura 12 A-D).

Figura 12. Imagens confocais de BMDMφ contendo MS controle (A), MS-LTB₄ (B), MS-CFAs (C) e MS-LTB₄+CFAs (D) fluorescentes. As setas mostram as micropartículas fagocitadas.

4.2.3 Determinação da concentração de citocinas no sobrenadante de cultura de BMDMφ incubados com microesferas

A fim de avaliar a ativação clássica de macrófagos, citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 α e IL-6, IL-12p40/p70 (indutora de resposta imunológica de padrão Th1) e IL-10 (citocina anti-inflamatória) tiveram suas concentrações determinadas no sobrenadante de cultura de BMDMφ estimulados com as diferentes micropartículas. A princípio foi feita a quantificação de TNF- α produzido por BMDMφ incubados com as MS durante 4 e 18, 24 e 48h (Figura 13A-D). Observamos que o aumento do tempo de

incubação das células com as diferentes MS contribuiu para a liberação de maiores quantidades da citocina. No entanto, estímulos em solução (LTB₄ ou CFAGs) não promoveram esse aumento, conforme constatado no tempo de incubação de 48 h (Figura 13D). Por este fato, a quantificação da produção desses mediadores foi realizada em cultura de 24 h.

Figura 13. Concentração de TNF- α em sobrenadante de cultura de BMDM ϕ incubados com as MS durante 4 h (A), e 18 h (B), 24 h (C) e 48 h (D). A determinação da concentração da citocina no sobrenadante de cultura celular foi feita por ELISA. LPS (0,5 μ g/mL) foi usado como controle positivo. Os valores são expressos como média $\pm$ S.E.M.; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em relação ao meio (células sem estímulo), # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ em relação à MS controle, \$\$\$ $P < 0,001$ em relação ao estímulo LTB₄ na forma de solução, e && $P < 0,01$ e &&& $P < 0,001$ são valores comparados ao estímulo CFAGs em solução. ND = valor não detectado pelo ensaio (teste t não pareado).

Tanto as MS controle ($445,44 \pm 128,16$ pg/mL) quanto as MS-LTB₄

(460,96 $\pm$ 116,52 pg/mL), MS-CFAGs (1138,33 $\pm$ 167,96 pg/mL) e MS-LTB₄+CFAGs (527,5 $\pm$ 110,28 pg/mL) induziram a produção significativa de TNF- α pelos BMDM ϕ após 24 h de incubação em comparação ao meio (25,46 $\pm$ 37,94 pg/mL). As MS-CFAGs foram mais eficientes quanto à indução da produção de TNF- α pelos BMDM ϕ , uma vez que as demais preparações tiveram o mesmo efeito da MS controle (Figura 14A). Quanto à produção de IL-1 α e IL-6, somente as MS contendo CFAGs (34,12 $\pm$ 21,33 pg/mL) induziram a liberação de maiores concentrações dessa citocina em relação aos demais estímulos (Figura 14B e C). A determinação da concentração de IL-12p40/p70 também foi realizada. Verificamos que as MS-CFAGs (391,32 $\pm$ 64,45 pg/mL) e MS-LTB₄ (418,41 $\pm$ 184,76 pg/mL) induziram a liberação de quantidades relevantes dessa citocina pelos BMDM ϕ , porém os dados não foram estatisticamente diferentes do estímulo com MS controle (296,17 $\pm$ 113,18 pg/mL). Menores quantidades de IL-12 foram liberadas pelos BMDM ϕ após incubação com os demais estímulos (Figura 14D). A IL-10, uma das citocinas responsáveis pelo controle da resposta imunológica devido ao seu efeito anti-inflamatório, também teve sua concentração determinada pelo mesmo método. Verificamos que não ocorreu a produção de concentrações significativas de IL-10 pelos BMDM ϕ (Figura 14E).

Figura 14. Concentração de TNF- α (A), IL-1 α (B), IL-6 (C), IL-12p40/p70 (D) e IL-10 (E) no sobrenadante de cultura de BMDM ϕ estimulados com as diferentes MS durante 24 h. LPS (0,5 μ g/mL) foi usado como controle positivo. Os valores são expressos como média $\pm$ S.E.M. (n = 8). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em comparação aos valores obtidos com células sem estímulos; ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ em relação à MS controle; § $P < 0,05$ e \$\$ $P < 0,01$ em relação ao estímulo LTB₄ em solução, e &&& $P < 0,001$, em comparação ao estímulo CFAGs em solução. ND = valor não detectado pelo ensaio (teste t não pareado).

4.2.4 Determinação da concentração de quimiocinas no sobrenadante de cultura de BMDM ϕ incubados com microesferas

As quimiocinas são potentes quimioatraentes para leucócitos durante o processo inflamatório. Assim sendo, BMDM ϕ foram incubados com diferentes estímulos, conforme descritos anteriormente, durante 24 h. O sobrenadante de cultura foi coletado e destinado à determinação da concentração de algumas quimiocinas por ELISA. Os resultados mostraram a liberação de quantidades significativas da quimiocina KC pelos BMDM ϕ incubados com MS controle ($152,32 \pm 17,37$ pg/mL), MS-LTB₄ ($321,76 \pm 23,31$ pg/mL), MS-CFAs ($458,45 \pm 27,19$ pg/mL) ou MS-LTB₄+CFAs ($452,17 \pm 23,73$ pg/mL) em comparação a células não estimuladas ($11,32 \pm 3,24$ pg/mL). Além disso, a concentração de KC produzida pelas células estimuladas com as MS-LTB₄ ou MS-CFAs foi superior a produzida pelas micropartículas controle ou LTB₄ ou CFAs na forma de solução, respectivamente (Figura 15A). Tanto as MS controle quanto as MS-LTB₄, MS-CFAs e MS-LTB₄+CFAs foram capazes de induzir a produção de MCP-1 (CCL2) pelos BMDM ϕ , conforme evidenciado pelas concentrações de quimiocinas detectadas ($49,08 \pm 3,78$ pg/mL, $54,48 \pm 4,98$ pg/mL, $77,63 \pm 6,64$ pg/mL, $63,99 \pm 5,66$ pg/mL, respectivamente) (Figura 15B). A produção desta quimiocina foi mais significativa com a estimulação pelas MS-CFAs. Em relação à produção de RANTES (CCL5), as MS contendo somente CFAs estimularam a liberação de concentrações relevantes desta quimiocina ($440,35 \pm 37,35$ pg/mL). Entretanto, as MS contendo LTB₄ e CFAs promoveram a produção de menores concentrações de RANTES ($150,98 \pm 39,07$ pg/mL) em comparação às micropartículas contendo somente CFAs, sendo similar à produção induzida pelas MS controle. O mesmo efeito foi verificado para as MS-LTB₄ ($134,45 \pm 35,06$ pg/mL).

Figura 15. Concentração de KC (A), MCP-1/CCL2 (B) e RANTES/CCL5 (C) por ELISA a partir do sobrenadante de cultura de BMDMφ estimulados com as diferentes MS durante 24 h. LPS foi usado como controle positivo. Os valores são expressos como média ± S.E.M. (3 experimentos, n = 9). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em comparação a células sem estímulos; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$, em comparação às MS controle; & $P < 0,05$, && $P < 0,001$, e \$ $P < 0,05$, \$\$ $P < 0,01$, em relação aos estímulos na forma de solução LTB₄ e CFAGs, respectivamente (teste *t* não pareado).

4.2.5 Determinação da concentração de nitrito no sobrenadante de cultura de BMDM ϕ incubados com microesferas

A produção de NO foi determinada a partir da detecção de nitrito (NO_2^-) a fim de avaliar a ativação dos BMDM ϕ incubados com as MS. Verificou-se que os BMDM ϕ produziram maiores quantidades de NO_2^- quando incubados durante 24h com MS controle ($0,60 \pm 0,05 \mu\text{M}$), MS-LTB $_4$ ($1,08 \pm 0,35 \mu\text{M}$), MS-CFAGs ($1,39 \pm 0,20 \mu\text{M}$) ou MS-LTB $_4$ +CFAGs ($1,00 \pm 0,13 \mu\text{M}$) em comparação a células sem estímulos ($0,10 \pm 0,02 \mu\text{M}$). A estimulação com LTB $_4$ ou CFAGs em solução também induziu quantidades significativas de NO_2^- ($0,27 \pm 0,02 \mu\text{M}$; $0,20 \pm 0,02 \mu\text{M}$, respectivamente). As MS contendo CFAGs ou LTB $_4$ e CFAGs foram capazes de estimular maiores concentrações de NO_2^- em relação às MS controle e aos estímulos em solução (Figura 16). O estímulo com LPS induziu a produção de NO_2^- como esperado.

Figura 16. Concentração de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante de cultura de BMDM ϕ estimulados com MS durante 24h. Os resultados são expressos como média $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em comparação aos valores do meio (células sem estímulo); # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ em relação às MS controle; e \$ $P < 0,05$ e &&& $P < 0,001$ em comparação aos estímulos LTB $_4$ e CFAGs em solução, respectivamente (teste t não pareado).

4.2.6 Análise de expressão de moléculas coestimuladoras na superfície de BMDM ϕ estimulados com microesferas

A apresentação de antígeno via molécula MHC, coestimulação e produção de citocinas determinantes do padrão de resposta são eventos indispensáveis para a ativação de células T durante a resposta imunológica. Neste contexto, a fim de estudar os efeitos imunomoduladores do LTB₄ e CFAGs liberados das micropartículas, BMDM ϕ foram incubados com as diferentes MS durante 18 h, e posteriormente, avaliou-se a expressão de moléculas coestimuladoras CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) na superfície celular através de citometria de fluxo. Quanto à porcentagem de células que expressaram CD80 e CD86 e à mediana de intensidade de fluorescência (MIF), observou-se uma tendência para um aumento de expressão dessas moléculas nos BMDM ϕ estimulados com as MS por 18 h em comparação aos estímulos em solução (LTB₄ ou CFAGs). No entanto, isto não foi diferente das células sem estímulo, e o LPS (controle positivo) não exerceu o seu efeito esperado (dados inconclusivos não mostrados).

Nesse contexto, nos experimentos seguintes, a expressão de CD80 e CD86 pelos BMDM ϕ incubados com as MS foi avaliada após 24 h, e além disso, utilizou-se como controle positivo LPS (0,5 μ g/mL) juntamente com IFN- γ (5 ng/mL). Todas as preparações foram capazes de aumentar a porcentagem de BMDM ϕ com expressão de CD86 em relação a células não estimuladas, sendo que o LPS exerceu seu efeito esperado quanto ao aumento desta coestimulação. Também se verificou um discreto aumento na MIF de CD86, ou seja, aumento na expressão de moléculas CD86 nos BMDM ϕ incubados com MS-LTB₄, MS-CFAGs ou CFAGs na forma de solução em comparação ao meio (Figura 17 A e B). Não houve diferenças significativas quanto à expressão de CD80 nos BMDM ϕ estimulados com as MS durante 24 h.

Figura 17. Expressão de CD86 na superfície de BMDMφ incubados com as diferentes MS durante 24h. A “gate” dos macrófagos foi feita de acordo com tamanho (“forward angle light scatter”/FSC) e granulosidade (“side light scatter”/SSC), e em seguida, analisou-se a expressão de F4/80. A partir disso, os BMDMφ F4/80⁺ foram analisados. Cada coluna representa a média de porcentagem de BMDMφ positivos para CD86 (A) $\pm$ S.E.M. e sua respectiva mediana de intensidade de fluorescência (MIF) (B)). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ são valores em relação ao meio; e & $P < 0,01$, são valores em comparação ao LTB₄ na forma de solução (teste *t* não pareado). Os resultados são representativos de 3 experimentos.

4.2.7 Avaliação da ativação de fator de transcrição NF-κB em BMDMφ estimulados com as microesferas

As micropartículas controle, contendo LTB₄ e/ou CFAs apresentaram ação imunomoduladora sobre os BMDMφ, sendo que os CFAs provenientes das MS foram capazes de estimular a produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas, nitrito e aumentaram discretamente a expressão celular da molécula coestimuladora CD86. Neste contexto, fomos avaliar se NF-κB

(subunidade p65) estaria envolvido na ativação dos BMDM ϕ pelas diferentes MS, uma vez que este fator de transcrição é um mediador crítico das respostas inflamatórias de macrófagos, ou seja, ativação clássica (PERKINS, 2007).

Os BMDM ϕ foram incubados com diferentes estímulos durante 4h, conforme descrito no item 3.13, e posteriormente, realizou-se o ensaio de imunofluorescência para detecção de NF- κ B p65. Então, verificou-se um aumento da ativação de NF- κ B nos BMDM ϕ estimulados com as MS controle, MS-CFAs, MS-LTB₄+CFAs e LTB₄ na forma de solução em comparação às células sem estímulos, uma vez que foi possível observar a translocação deste fator de transcrição para o núcleo celular. Também ocorreu a translocação de NF- κ B para o núcleo dos BMDM ϕ não estimulados, visto que uma ativação constitutiva de NF- κ B é essencial para a sobrevivência de macrófagos (PAGLIARI *et al.*, 2000). O estímulo com MS-LTB₄ e CFAs na forma de solução não promoveram uma ativação relevante do fator de transcrição, enquanto que o LPS exerceu um efeito esperado nesta ativação (Figura 18 A-H).

Figura 18. Imagens confocais de BMDM ϕ estimulados com meio (A), LPS 0,5 μ g/mL (B), MS controle (C), MS-LTB₄ (D), MS-CFAqs (E), MS-LTB₄+CFAqs (F), LTB₄ (3×10^{-8} M) (G) e CFAqs (50 μ g/mL) (H). As imagens da direita, centro e esquerda mostram a marcação para núcleo celular (DAPI, azul), NF- κ B (vermelho) e colocalização das imagens (rosa), respectivamente. As setas indicam a presença ou não de NF- κ B no núcleo celular.

Parte III – Atividades biológicas de microesferas *in vivo*

4.3 Ensaio de proliferação de linfócitos e determinação da concentração de IFN- γ

Uma série de estudos empregando a microencapsulação de antígenos vem mostrando o potencial das MS como carreadores, assim como adjuvantes, durante os procedimentos de imunização (MEN *et al.*, 1995; GANDER *et al.*, 2005; FENG *et al.*, 2006; JONES, 2008). No presente estudo, verificamos o potencial imunomodulador de MS contendo LTB₄ e/ou CFAGs *in vitro*, sendo que as MS contendo somente CFAGs promoveram um aumento da capacidade fagocítica de BMDM ϕ e liberação de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12), quimiocinas e nitrito essenciais para os mecanismos de defesa durante a histoplasmose pulmonar murina.

Neste contexto, as MS contendo LTB₄ e/ou CFAGs foram empregadas na imunização murina a fim de analisar sua capacidade de ativação da resposta imune celular. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram divididos em diferentes grupos experimentais e receberam via subcutânea preparações de CFAGs emulsificados em adjuvante de Freund, MS controle, MS-CFAGs e MS-LTB₄+CFAGs, conforme descrito no item 3.14. Um grupo controle não recebeu nenhuma dose durante a imunização. Após 14 dias, os camundongos receberam um desafio intravenoso com CFAGs, e após três dias desse desafio, o baço de cada animal foi removido e células não aderentes provenientes de esplenócitos foram obtidas. Tais células (linfócitos) foram cocultivadas, durante 3 dias, com BMDM ϕ previamente estimulados com CFAGs na forma de solução ou microencapsulada. Após este período, avaliou-se a proliferação de linfócitos a partir da diluição de CFSE através de citometria de fluxo, e a produção de IFN- γ no sobrenadante desta cocultura por ELISA (foram realizados dois experimentos de imunização com diferentes lotes de MS).

A figura 19 mostra a porcentagem de linfócitos CD4⁺ CFSE⁺ (A) e CD8⁺ CFSE⁺ (B) que proliferaram após reestímulo *ex vivo*. Os linfócitos CD4⁺

provenientes de animais imunizados com as MS-LTB₄+CFAs e CFAs emulsificados em adjuvante de Freund foram capazes de proliferar após reestímulo *ex vivo* com CFAs (formas solúvel e microencapsulada) de maneira semelhante aos estímulos policlonais anti-CD3/anti-CD28. No entanto, as células CD4⁺ oriundas de animais que receberam doses de MS-CFAs ou MS controle proliferaram de modo similar às células dos animais não imunizados. Não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, provavelmente devido ao alto desvio-padrão e a pequena amostragem experimental, apesar da maior taxa de proliferação dos grupos MS-LTB₄+CFAs e CFAs/adjuvante (Figura 19 A). Em relação à porcentagem de proliferação das células CD8⁺, observou-se o mesmo perfil de resultado, não havendo diferenças significativas entre os diferentes grupos (Figura 19 B).

A liberação de IFN- γ , citocina característica de resposta imune do padrão Th1, foi avaliada no sobrenadante de cocultura dos linfócitos obtidos dos animais previamente imunizados (Figura 20). Verificou-se uma maior produção de IFN- γ pelos linfócitos de animais os quais receberam CFAs/adjuvante ou MS-LTB₄+CFAs e que foram reestimulados *ex vivo* com CFAs (BMDM ϕ previamente pulsados com CFAs), sendo que a produção mediante a imunização com CFAs/adjuvante ($4110,6 \pm 928,48$ pg/mL) foi estatisticamente significativa em comparação ao grupo não imunizado ($1298,5 \pm 415,52$ pg/mL). No entanto, não ocorreu uma produção relevante desta citocina pelas células reestimuladas e obtidas do grupo experimental MS-CFAs ($831,61 \pm 94,83$ pg/mL e $860,79 \pm 236,05$ pg/mL, para reestímulo com BMDM ϕ incubados com CFAs e MS-CFAs, respectivamente).

Figura 19. Proliferação de células CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) provenientes de animais imunizados ou não com MS controle, MS-CFAs, MS-LTB₄+CFAs ou CFAs/adjuvante e reestimuladas *ex vivo* durante 3 dias. Células do grupo não imunizado e MS controle foram estimuladas com CFAs e salina, respectivamente. Células dos grupos MS-CFAs e MS-LTB₄+CFAs foram estimuladas com CFAs ou com as respectivas MS. E as células do grupo CFAs+adjuvante Freund foram incubadas com CFAs. O estímulo policlinal com anti-CD3/anti-CD28 foi utilizado como controle positivo de proliferação. O ensaio de proliferação foi avaliado a partir da diluição do CFSE através de citometria de fluxo. Os dados referem-se à porcentagem de células que proliferaram (média ± S.E.M.) e são representativos de um experimento (n = 03).

Figura 20. Concentração de IFN- γ no sobrenadante de cocultura de linfócitos reestimulados *ex vivo*. (sobrenadante da mesma cultura do experimento cujos resultados estão na figura 20). A concentração da citocina foi avaliada através de ELISA. Os valores são expressos como média $\pm$ S.E.M.; * $P < 0,05$, valores em comparação ao grupo não imunizado (teste t não pareado).

Com base nesses resultados, foi realizado outro experimento de imunização murina empregando as MS. Foram obtidos dados mais homogêneos e a porcentagem de proliferação de linfócitos totais foi avaliada (Figura 21). Os linfócitos provenientes de animais do grupo MS controle, MS-CFAs e MS-LTB₄+CFAs foram capazes de proliferarem em resposta à reestimulação *ex vivo*, sendo que a taxa de proliferação dos linfócitos do grupo MS-CFAs ($82,20 \pm 1,34$ %), reestimulados com BMDM ϕ incubados previamente com CFAs na forma microencapsulada, foi estatisticamente maior em comparação ao grupo MS controle ($72,53 \pm 2,67$ %) e não imunizado ($61,13 \pm 2,59$ %).

Também foi analisada a produção de IFN- γ no sobrenadante de cocultura dos linfócitos reestimulados. Porém, não foi possível detectar concentrações significativas desta citocina pelo método de ELISA utilizado.

Figura 21. Proliferação de linfócitos totais provenientes de animais imunizados ou não com MS controle, MS-CFags, MS-LTB₄+CFags ou CFags/adjuvante e reestimuladas *ex vivo* durante 3 dias. Células do grupo não imunizado e MS controle foram estimuladas com CFags e salina, respectivamente. Células dos grupos MS-CFags e MS-LTB₄+CFags foram estimuladas com CFags ou com as respectivas MS. E as células do grupo CFags+adjuvante Freund foram incubadas com CFags. O estímulo policlonal com anti-CD3/anti-CD28 foi utilizado como controle positivo de proliferação. O ensaio de proliferação foi avaliado a partir da diluição do CFSE através de citometria de fluxo. Os dados referem-se à porcentagem de células que proliferaram (média $\pm$ S.E.M.) e são representativos de um experimento (n = 04). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, são valores em comparação ao grupo não imunizado; ## $P < 0,01$, dados em comparação ao grupo cuja administração subcutânea foi MS controle.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Estudos empregando MS constituídas por PLGA, que permitem a liberação sustentada e/ou controlada de várias substâncias, vêm sendo realizados por diversos grupos de pesquisa. A encapsulação de antígenos em MS de PLGA é uma ferramenta útil para a eficiente ativação do sistema imune durante os processos vacinais (MEN *et al.*, 1995; BYRD & CASSELS, 2006; FENG *et al.*, 2006; FAISAL *et al.*, 2009). No presente estudo, MS biodegradáveis de PLGA, contendo ou não LTB₄ e CFAGs, encapsulados isoladamente ou em conjunto, foram preparadas a partir do método de simples ou dupla emulsão, seguido pela evaporação/extração do solvente, dependendo da natureza de cada molécula alvo do processo de microencapsulação. Estas micropartículas foram caracterizadas quanto ao diâmetro, potencial zeta, morfologia, eficiência de encapsulação, cinética de liberação *in vitro* e integridade dos CFAGs.

As MS apresentaram médias de diâmetros entre 4,0 a 9,0 µm (Figura 2 A-D). A coencapsulação de CFAGs e LTB₄ em MS aumentou o diâmetro destas micropartículas (9,16 µm) quando comparado às MS controle (6,64 µm), MS-LTB₄ (4,17 µm) ou MS-CFAGs (7,63 µm). Além disso, o processo de microencapsulação mostrou-se eficiente uma vez que não provocou um aumento excessivo no diâmetro das MS. Todas as preparações apresentaram uma distribuição de tamanho heterogênea, sendo que, em geral, os diâmetros foram menores que 10 µm. Isto contribuiu para a eficiente fagocitose das mesmas pelos BMDMφ, corroborando para estudos *in vitro* prévios descritos na literatura (CHAMPION *et al.*, 2008). Estudos *in vivo* relacionados a processos de imunização sugerem que diâmetros maiores do que 10 µm contribuem para o aumento da deposição de MS no sítio de injeção, aumentando o tempo de persistência do antígeno, por ser liberado continuamente no local, e o escape das MS pelas células fagocíticas (JOHANSEN *et al.*, 2000; LIMA & RODRIGUES, 1999). Assim, a caracterização das MS quanto ao diâmetro é

importante por influenciar a fagocitose e determinar a taxa de liberação de antígenos durante os processos de imunização.

Neste estudo, o polímero utilizado para preparar as MS (PLGA 50:50) não causa injúria tecidual, uma vez que é inerte e biodegradável (BAZILE *et al.*, 1992). Estas características permitiram a apropriada administração das MS de PLGA contendo LTB₄ e CFAs ou somente CFAs em camundongos durante as imunizações. O polímero PLGA 50:50, constituído por ésteres derivados de ácidos láctico e glicólico, possui residual de carga elétrica negativa. A análise de potencial zeta foi realizada a fim de verificar se a encapsulação de substâncias de natureza protéica (CFAs) alteraria a carga elétrica da partícula, tornando a superfície da mesma mais ou menos carregada negativamente, e com isso, respectivamente, dificultando ou favorecendo sua interação com as células alvo. Nossos resultados mostraram que a encapsulação de CFAs em MS não provocou mudanças significativas no potencial zeta quando comparado às MS controle. Além disso, as MS-LTB₄ apresentaram pequena diferença no valor do potencial zeta em comparação às demais preparações, possivelmente devido à distribuição de carga na superfície polimérica promovida pelos lipídeos, porém isto não resultou em alterações relevantes no residual de carga elétrica negativa das MS (Figura 3 A-D).

A morfologia das diferentes MS foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (Figura 4 A-D). Não ocorreram alterações significativas na forma esférica e superfície lisa das MS contendo LTB₄ e/ou CFAs em comparação às MS controle. Somente poucas e discretas irregularidades na superfície das micropartículas puderam ser observadas, possivelmente devido à alta tensão elétrica aplicada para a aquisição das imagens em maior aumento ou à associação dos CFAs na superfície externa da matriz polimérica.

Nos sistemas de micropartículas poliméricas, a quantificação precisa do princípio ativo encapsulado é uma etapa crítica (FENG *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 1997). Nesse estudo, a quantificação do LTB₄ encapsulado foi determinada através de CLAE. Foram obtidas eficientes taxas de encapsulação desse

mediador lipídico tanto nas MS-LTB₄ (46,25 %) quanto nas MS- LTB₄+CFAs (43,87 %). Além disso, a coencapsulação de antígenos protéicos não comprometeu a incorporação do LTB₄ nas mesmas MS. A determinação da eficiência de microencapsulação das proteínas depende do método de preparação e também de suas características estruturais. A maioria dos métodos empregados para determinar a eficiência de encapsulação são baseados na digestão do polímero com solução de NaOH/SDS (FENG *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 1997) ou extração do conteúdo liberado com PBS após a dissolução empregando solventes orgânicos (GUPTA *et al.*, 1997). Neste contexto, alguns autores sugerem que é difícil adotar um método preciso para a quantificação protéica após a microencapsulação (JOHANSEN *et al.*, 2000). Neste estudo, foi determinada a eficiência de encapsulação dos CFAs, através da quantificação dos mesmos pelo ensaio com reagente Coomassie. Ao empregar este método, adotamos cuidadosamente um procedimento a fim de minimizar possível interferência entre a acetonitrila (utilizada para dissolver as MS) e o reagente Coomassie, conforme descrito no item 3.5.2. Assim, verificou-se que os CFAs foram eficientemente encapsulados tanto nas MS-CFAs (44,30 %) quanto nas MS-LTB₄+CFAs (54,14 %). Da mesma forma, a adição de LTB₄ não interferiu na encapsulação dos antígenos protéicos.

Estudos de liberação *in vitro* demonstraram a liberação sustentada do LTB₄ e/ou CFAs ao longo do período avaliado (até 14 dias). Houve um efeito “burst” inicial da liberação do LTB₄ proveniente das MS-LTB₄ e MS-LTB₄+CFAs, no qual 92 % e 56 % do mediador lipídico, respectivamente, foram liberados no tempo 0h (Figura 7A e C). A coencapsulação com CFAs promoveu um atraso na liberação inicial do LTB₄, provavelmente devido à presença de CFAs na superfície da matriz polimérica, mas não interferiu no seu perfil de liberação constante. Cerca de 70 % dos antígenos protéicos encapsulados em MS-LTB₄+CFAs foram liberados em 2h (Figura 7C). Nas MS-CFAs também se verificou um efeito “burst” até 4h, no qual a liberação dos antígenos atingiu aproximadamente 50% (Figura 7B). O efeito “burst” é decorrente da presença das substâncias associadas à superfície externa da

matriz polimérica (ou não encapsuladas) e da sua difusão através dos poros nas MS (GITEAU *et al.*, 2008). A liberação total do LTB₄ e/ou CFAGs é dependente da degradação das micropartículas, a qual pode contribuir para os efeitos observados. Após o efeito “burst”, o conteúdo restante nas MS pode ser liberado por um longo período de tempo. Estes resultados mostram que a encapsulação do LTB₄ e/ou CFAGs é capaz de conferir uma liberação sustentada dessas substâncias durante o período de tempo avaliado. Isto poderia constituir uma boa estratégia para as imunizações usando MS-LTB₄+CFAGs ou MS-CFAGs, uma vez que os CFAGs foram liberados em até 14 dias (Figura 7B e C), e a liberação “burst” do LTB₄ a partir das MS-LTB₄+CFAGs pode induzir o aumento do recrutamento e da ativação de células fagocíticas para o local de injeção. Estudos envolvendo a encapsulação de proteínas em MS de PLGA têm mostrado que os perfis de liberação são relacionados à porosidade do polímero, degradação e também aos diâmetros das MS (FENG *et al.*, 2006, SINHA & TREHAN, 2003; LIMA & RODRIGUES Jr., 1999).

O processo de microencapsulação pode levar à desestabilização e agregação das proteínas encapsuladas, e assim, afetar a sua imunogenicidade (O’HAGAN *et al.*, 1998). Portanto, a integridade dos CFAGs extraídos das MS foi investigada usando SDS-PAGE. Por este método, não foi observada a degradação da proteína com massa molecular próxima a 80 kDa, que é similar à região HIS-80 (69 – 82 kDa) descrita na literatura, e nem da proteína cuja massa molecular é de aproximadamente 70 kDa (Figura 8). A proteína com massa molecular próxima a 80 kDa é considerada imunogênica, uma vez que mostrou eficácia na proteção contra a histoplasmose pulmonar murina, e também, apresentou capacidade para estimular a resposta imune celular ao *H. capsulatum* (GOMEZ *et al.*, 1991, 1992). No entanto, as demais bandas (57, 31 e 9-12 kDa) descritas no trabalho de Sá-Nunes *et al.* (2005) não foram detectadas, sugerindo possível degradação pelo método de microencapsulação.

A partir da caracterização das micropartículas, algumas atividades biológicas foram avaliadas utilizando macrófagos obtidos através da diferenciação de precursores existentes na medula óssea murina (BMDM ϕ), como modelos celulares. Para confirmação do fenótipo das células diferenciadas *in vitro*, os BMDM ϕ foram analisados, por citometria de fluxo, quanto à expressão de F4/80 na sua superfície (marcador fenotípico de macrófagos) (AUSTYN & GORDON, 1981). Verificou-se que 75,3 % dos BMDM ϕ expressavam esse marcador na superfície celular, o que indica uma eficiente taxa de diferenciação (Figura 9A). Além disso, avaliou-se a viabilidade dos BMDM ϕ através da exclusão por azul de tripan e marcação com Anexina-V/FITC e Iodeto de propídio (PI). Foi possível constatar que os BMDM ϕ , ao término do processo de diferenciação, estavam viáveis: 92 % das células não incorporaram o azul de tripan e 84 % dos BMDM ϕ não tiveram marcação positiva para a anexina-V/FITC e nem para PI (Figura 9B). Isto indica que a maioria das células não estava em processo de apoptose e nem necrose, e portanto, apropriadas para a utilização em experimentos envolvendo fagocitose e produção de mediadores solúveis.

Como previamente descrito (CHAMPION *et al.*, 2008) e já mencionado anteriormente, o tamanho das MS é crítico durante o processo de fagocitose pelos macrófagos. Micropartículas com um diâmetro médio de 5 - 6 μ m podem eficientemente interagir com os “ruffles” da membrana presentes na superfície dos macrófagos (tais estruturas são formadas por filamentos de actina e desempenham funções importantes durante a fagocitose). Sendo assim, nossos resultados mostram que um grande número de MS com diâmetros menores foi observado dentro das células após 4 h de incubação (Figura 11 A-D). Da mesma forma, micropartículas contendo LTB₄ e/ou CFAs foram mais eficientemente fagocitadas quando comparadas às MS controle (Figura 10B). Estes dados estão de acordo com estudos prévios empregando macrófagos peritoneais murinos que mostraram que MS-LTB₄ são avidamente fagocitadas (NICOLETE *et al.*, 2007). Nossos resultados mostram que as MS-LTB₄+CFAs

são ainda mais fagocitadas pelos BMDM ϕ , sugerindo assim que os CFAs e o mediador lipídico coencapsulados sinergizam para o aumento da fagocitose. Isto pode ser evidenciado através das imagens confocais dos BMDM ϕ contendo no seu interior uma grande quantidade de MS-LTB₄+CFAs fluorescentes (Figura 12D). Pode-se também inferir que o LTB₄ e os CFAs liberados das MS menores capturadas foram capazes de aumentar a capacidade fagocítica dos macrófagos, e este fato pode ser relacionado ao tamanho das MS, bem como às altas taxas de liberação do seu conteúdo até 4h (Figura 7 A-C).

A fim de avaliar as atividades imunomoduladoras das MS sobre os macrófagos murinos, citocinas, tais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-10, quimiocinas (KC, MCP-1 e RANTES) e nitrito (NO₂⁻) tiveram suas concentrações determinadas no sobrenadante de cultura de BMDM ϕ estimulados com as diferentes MS. Micropartículas contendo LTB₄ e CFAs ou somente CFAs foram capazes de induzir a liberação de quantidades relevantes de TNF- α pelos BMDM ϕ , quando comparado com células sem estímulos ou com substâncias na forma de solução (Figura 14A). As células estimuladas com MS controle também produziram quantidades significativas dessa citocina. Estudos mostraram que MS constituídas por PLGA podem funcionar como adjuvantes particulados (JONES, 2008), uma vez que são capazes de induzir a maturação de células dendríticas (YOSHIDA *et al.*, 2006; BABENSEE, 2008) e a produção de citocinas inflamatórias por macrófagos peritoneais, quando presentes na forma de biomaterial solúvel (DING *et al.*, 2007). No entanto, os CFAs liberados das MS-CFAs foram mais potentes em ativar os BMDM ϕ a produzirem TNF- α do que a própria micropartícula controle. Da mesma forma, as MS-CFAs induziram maior liberação de IL-1 e IL-6, ao contrário das demais preparações (Figura 14 B e C). As MS-CFAs também estimularam a liberação de IL-12 pelos BMDM ϕ , porém este efeito não foi estatisticamente diferente da produção induzida pelas MS controle (Figura 14D). BMDM ϕ não foram capazes de produzir concentrações significativas da

citocina anti-inflamatória IL-10 após estimulação com as diferentes MS (Figura 14E). A coencapsulação do LTB₄ nessas MS não conferiu maior ativação dos BMDM ϕ em comparação às MS contendo somente CFAs. Desta maneira, sugere-se que o LTB₄ liberado pelas MS no meio extracelular é capaz de interagir com seus receptores de alta afinidade (BLT1), existentes na superfície dos macrófagos, contribuindo, assim, para o aumento da fagocitose como mostrado nos resultados anteriores. O LTB₄ é capaz de intensificar a fagocitose via BLT1 e subsequentes vias de sinalização (PETERS-GOLDEN *et al.*, 2004), que envolvem moléculas reguladoras desse processo, tais como a fosfolipase C, cuja ativação culmina no aumento do cálcio intracelular e ativação de proteína kinase C, e PI3K (UNDERHILL & OZINSKY, 2002). No entanto, este mediador lipídico também pode ser liberado no interior da célula após a fagocitose das MS. Uma vez que o LTB₄ também é um ligante para o receptor nuclear PPAR- α , esta interação está envolvida no controle da inflamação (DEVCHAND *et al.*, 1996; WYMAN & SCHNEITER, 2008; NICOLETE *et al.*, 2008), e assim, poderia ser responsável pela modulação da ativação celular desencadeada pelos CFAs liberados das mesmas MS. Futuros experimentos devem ser realizados a fim de investigar o envolvimento de PPAR- α .

Outro parâmetro de ativação celular avaliado foi a produção de NO₂⁻ pelos BMDM ϕ incubados com as MS. Também foi possível constatar que os CFAs liberados das MS-CFAs foram mais eficientes em estimular a produção de NO₂⁻ pelos macrófagos do que os demais estímulos (Figura 16). Vale ressaltar que o NO também é importante para o controle e proteção na histoplasmose (ALLENDORFER & DEEPE Jr., 1998), e por isso, as MS-CFAs parecem apresentar efeitos sobre as funções efetoras (microbicidas) dos macrófagos.

A produção aumentada dos mediadores inflamatórios sugere que os CFAs liberados das MS foram capazes de induzir a ativação clássica dos macrófagos (MOSSER, 2003; MANTOVANI *et al.*, 2004). É fato que durante o processo de fagocitose e ativação celular, os macrófagos podem produzir citocinas inflamatórias e NO (UNDERHILL & OZINSKY, 2002). Uma vez que a

produção de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12 são essenciais para o desenvolvimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro durante a infecção pelo *H. capsulatum* (DEEPE Jr. & GIBBONS, 2006; DEEPE Jr. & McGUINNESS, 2006; CAIN & DEEPE Jr., 2000) e a resposta de padrão Th1 contribui para a geração de anticorpos opsonizantes (CUTLER *et al.*, 2007), as MS-CFAs desenvolvidas neste estudo foram empregadas em processos de imunização.

Em relação à produção de KC, MCP-1 e RANTES, quimiocinas produzidas por macrófagos ativados de forma clássica (MANTOVANI *et al.*, 2004), verificou-se que todas as preparações, inclusive as MS controle, provocaram a sua liberação pelos BMDM ϕ . As MS-LTB₄ induziram produção significativa de KC, e as MS-CFAs mostraram efeitos relevantes sobre os BMDM ϕ quanto à produção de KC, MCP-1 e RANTES (Figura 15 A-C). Da mesma forma que a produção de citocinas inflamatórias, a encapsulação do LTB₄ juntamente aos CFAs em MS não potencializou a liberação das quimiocinas, sugerindo assim, a possibilidade do mediador lipídico agir via receptores nucleares para o controle da resposta celular (DEVCHAND *et al.*, 1996; WYMAN & SCHNEITER, 2008). Este fenômeno foi bastante evidente quando se avaliou a produção de RANTES pelas células estimuladas com MS-LTB₄ ou MS-LTB₄+CFAs (Figura 15C).

Os CFAs liberados das micropartículas desenvolvidas neste estudo revelaram-se potentes imunoestimuladores das funções dos BMDM ϕ , uma vez que foram capazes de induzir a liberação de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6), IL-12 (citocina indutora de padrão de resposta Th1), quimiocinas (KC, MCP-1 e RANTES) e NO (mediador microbicida). Além disso, verificou-se que os CFAs provenientes da parede e membrana celulares do *H. capsulatum* compreendem principalmente proteínas de massa molecular próximas a 80 kDa, cujas sequências de aminoácidos possuem homologia à HSP-70 (GOMEZ *et al.*, 1992; ALLENDOERFER *et al.*, 1996). Assim sendo, estudos mostram que a HSP-70 possui atividades imunorreguladoras por se ligar a receptores do tipo *Toll* (TLR2 e TLR4) e desencadear cascatas de sinalização intracelular que culminam no influxo de cálcio, ativação de fator de transcrição NF- κ B e,

consequentemente, a expressão de citocinas inflamatórias, indução de IL-12 e a liberação de NO (ASEA *et al.*, 2002; VABULAS *et al.*, 2002; PANJWANI *et al.*, 2002). Portanto, os resultados envolvendo as MS contendo CFAGs sugerem que estes antígenos protéicos podem mediar suas atividades imunoestimuladoras sobre os BMDM ϕ através destas mesmas vias de ativação, já que apresentam homologia à HSP-70.

A expressão de moléculas coestimuladoras, tais como CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), na superfície de BMDM ϕ incubados com as MS contendo LTB₄ e/ou CFAGs foi avaliada por citometria de fluxo, sendo que a estimulação com LPS+IFN- γ foi utilizada como controle positivo. Os resultados mostraram que as MS contendo LTB₄ e/ou CFAGs, inclusive as MS controle, podem induzir um aumento discreto na expressão de CD86 pelos BMDM ϕ (Figura 17). No entanto, não foram evidenciadas diferenças significativas quanto à expressão de CD80 na superfície dos BMDM ϕ incubados com as diferentes MS.

Diante desses resultados e com o objetivo de investigar a relação entre o fator de transcrição NF- κ B e a ativação de BMDM ϕ pelas MS, a ativação de NF- κ B foi avaliada através de imunofluorescência, nos BMDM ϕ estimulados com as diferentes MS. O NF- κ B é um importante fator de transcrição relacionado com a expressão de vários genes envolvidos durante as respostas inflamatória e imune. Sua ativação e consequente translocação para o núcleo dependem da fosforilação e degradação de inibidores citoplasmáticos (I κ B) (PERKINS, 2007). Assim, foi possível constatar que tanto as MS controle quanto as MS-CFAGs e MS-LTB₄+CFAGs apresentaram maior ativação de NF- κ B em comparação a células não estimuladas. O mesmo fenômeno não ocorreu para as MS-LTB₄ (Figura 18A - H), sugerindo o controle da ativação celular via PPAR- α . Ocorreu a translocação do fator de transcrição para o núcleo dos BMDM ϕ não estimulados, uma vez que uma ativação constitutiva de NF- κ B é essencial para a sobrevivência dos macrófagos (PAGLIARI *et al.*, 2000). Diante disso, ocorreu a translocação de NF- κ B para o núcleo durante a

ativação dos BMDM ϕ induzida pelas MS. A repetição destes experimentos será realizada a fim de confirmar os dados obtidos.

Além das atividades biológicas *in vitro*, as MS-CFAGs e MS-LTB₄+CFAGs foram administradas *in vivo* a fim de avaliar a resposta imune celular, através da produção de IFN- γ e ensaio de proliferação dos linfócitos provenientes de animais imunizados e reestimulados (ensaio *ex vivo*). Verificamos primeiramente que a imunização com as MS-LTB₄+CFAGs provocaram uma linfoproliferação e produção de IFN- γ semelhante a induzida pela administração de CFAGs em adjuvante de Freund, porém não foram obtidas diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo não imunizado ou MS controle (Figuras 19 e 20). Posteriormente, foi possível observar uma significativa linfoproliferação estimulada pela imunização com MS-CFAGs e MS-LTB₄+CFAGs em comparação ao grupo não imunizado. No entanto, esta resposta não foi considerada estatisticamente diferente daquela obtida a partir da administração de MS controle (Figura 21) e também não foi detectada a produção de IFN- γ .

Diante dos resultados obtidos com a imunização murina empregando as diferentes MS, consideramos, a princípio, que a liberação *in vivo* do LTB₄ e CFAGs possa apresentar um perfil de liberação diferente do observado *in vitro*, ou seja, uma liberação mais tardia. Apesar da difusão direta através das superfícies porosas das MS, a liberação das substâncias microencapsuladas também depende do diâmetro e da degradação das MS, sendo que quanto maior o diâmetro, mais demorada e prolongada é a liberação do conteúdo incorporado (FENG *et al.*, 2006, SINHA & TREHAN, 2003; LIMA & RODRIGUES Jr., 1999). Além disso, as MS contendo LTB₄ e/ou CFAGs não foram potentes em induzir a produção de IL-12 pelos BMDM ϕ *in vitro*. Sabe-se que a IL-12 possui um importante papel na defesa do hospedeiro contra o *H. capsulatum*, uma vez que possibilita a produção de IFN- γ e o estabelecimento de uma resposta imune celular de padrão Th1, considerada essencial para o controle e a imunoproteção durante a histoplasmose (ZHOU *et al.*, 1995; CAIN & DEEPE JR, 2000; CUTLER, 2007).

Muitos estudos vêm mostrando o potencial imunogênico do antígeno de superfície celular HSP-60 (isolado protéico HIS-62) (GOMEZ *et al.*, 1991; GOMEZ *et al.*, 1995), cuja detecção em gel após extração dos CFAs das MS não foi possível. A imunização murina com HSP-60 de *H. capsulatum* já demonstrou seu efeito protetor, uma vez que é capaz de induzir maior produção de citocinas do padrão Th1 (IL-12 e IFN- γ) em comparação à HSP-70 (isolado protéico HIS-80) (DEEPE JR. & GIBBONS, 2002). Dessa forma, o desencadeamento de uma resposta imune celular pelas MS-CFAs ou MS-LTB₄-CFAs não ficou evidente com o ensaio de linfoproliferação e produção de IFN- γ , apesar da atividade imunoestimuladora *in vitro* dos CFAs, que compreendem o antígeno de 80 kDa homólogo à HSP-70. Sendo assim, faz-se necessário testar quantidades maiores de MS administradas *in vivo* e/ou aumentar a quantidade de CFAs microencapsulada.

Neste estudo foram desenvolvidas micropartículas biodegradáveis (PLGA) contendo LTB₄ e/ou CFAs através do processo de simples ou dupla emulsão com evaporação do solvente. Este sistema permitiu uma eficiente encapsulação tanto do mediador lipídico quanto dos antígenos protéicos e um perfil de liberação *in vitro* constante ao longo dos dias avaliados. O residual de carga negativa do PLGA e a morfologia das MS não foram alterados com o processo de microencapsulação; da mesma forma, a integridade dos CFAs não foi prejudicada. O tamanho adequado das MS contribuiu para sua eficiente captura pelos BMDM ϕ . A bioatividade das substâncias microencapsuladas foi preservada, uma vez que elas modularam a liberação de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12, quimiocinas (KC, MCP-1 e RANTES), e nitrito após a fagocitose das MS pelos BMDM ϕ . Além disso, o estímulo com as diferentes MS provocou um discreto aumento na expressão de CD86 na superfície de BMDM ϕ . Verificamos também a participação do fator de transcrição NF- κ B durante a ativação de BMDM ϕ induzida pelas MS. Apesar da resposta linfoproliferativa desencadeada a partir da imunização murina com MS-LTB₄+CFAs ou MS-CFAs, não foi possível confirmar um papel imunoprotetor das MS. Futuros experimentos

serão realizados a fim de investigar o potencial profilático das MS contendo LTB₄ e/ou CFAGs na histoplamose.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. O método de microencapsulação empregado para obtenção das MS poliméricas biodegradáveis permitiu uma eficiente encapsulação e uma liberação sustentada tanto de LTB₄ quanto de CFAGs. Não ocorreram significativas alterações no potencial zeta e morfologia das diferentes MS. Além disso, a integridade dos CFAGs microencapsulados foi preservada.

2. As MS contendo LTB₄ e/ou CFAGs apresentaram uma distribuição de diâmetro adequada, a qual proporcionou a sua fagocitose pelos BMDM ϕ . Além disso, as MS foram capazes de modular a ativação dos BMDM ϕ , evidenciada pela produção de citocinas, tais como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12, quimiocinas (KC, MCP-1 e RANTES) e nitrito. Também ocorreu um discreto aumento na porcentagem de expressão celular da molécula coestimuladora CD86 após estímulo com as diferentes MS. Dentre as preparações, a MS-CFAGs foram mais potentes na atividade imunoestimuladora sobre os BMDM ϕ .

3. A existência de antígenos protéicos com homologia à HSP-70 pode mediar o efeito imunoestimulador dos CFAGs microencapsulados. O envolvimento do fator de transcrição NF- κ B foi evidenciado durante a ativação dos BMDM ϕ . Ao contrário, a incorporação de LTB₄ em MS parece contribuir para o controle da ativação celular, possivelmente através da interação do mediador lipídico com o receptor nuclear PPAR- α .

4. As MS-CFAGs e MS-LTB₄+CFAGs empregadas na imunização murina não foram capazes de induzir uma significativa resposta imune celular, analisada através da linfoproliferação e produção de IFN- γ . Futuros experimentos envolvendo a avaliação da sobrevivência de animais infectados pelo *H. capsulatum* e previamente imunizados com as MS serão realizados.

Além disso, modificações na metodologia são necessárias, tais como o aumento da quantidade de CFAs microencapsulada.

Portanto, podemos concluir que as MS poliméricas biodegradáveis propostas poderiam ser utilizadas com o intuito de ativarem macrófagos murinos através do aumento da fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios e expressão de molécula coestimuladora. No entanto, consideramos que algumas alterações envolvendo a microencapsulação dos CFAs devam ser realizadas a fim de confirmar o potencial profilático e/ou terapêutico das MS contendo LTB₄ e/ou CFAs durante a histoplasmose murina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEENDOERFER, R.; DEEPE Jr., G. S. Blockade of endogenous TNF- α exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms. **J. Immunol.**, vol. 160, p. 6072-6082, 1998.

ALLEENDOERFER, R.; MARESCA, B.; DEEPE Jr., G. S. Cellular immune responses to recombinant Heat Shock Protein 70 from *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.**, vol. 64 (10), p. 4123-4128, 1996.

ASEA, A.; REHLI, M.; KABINGU, E.; BOCH, J. A.; BARE, O.; AURON, P. E.; STEVENSON, M. A.; CALDERWOOD, S. K. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 277 (17), p. 15028-15034, 2002.

AUDRAN, R.; PETER, K.; DANNULL, J.; MEN, Y.; SCANDELLA, E.; GROETTRUP, M.; GANDER, B.; CORRADIN, G. Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages in vitro. **Vaccine**, vol. 21, p. 1250-1255, 2003.

AUSTYN, J. M.; GORDON, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. **Eur. J. Immunol.**, vol. 11 (10), p. 805-815, 1981.

BABENSEE, J. E. Interaction of dendritic cells with biomaterials. **Seminars in Immunology**, vol. 20, p. 101–108, 2008.

BAZILE, D. V.; ROPERT, C.; HUVE, P.; VERRECHIA, T.; MARLAND, M.; FRYDMAN, A.; VEILLARD, M.; SPENLEHAUER, G. Body distribution of fully biodegradable ¹⁴C-poly (lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. **Biomaterials**, vol. 13, p. 1093-1102, 1992.

BYRD, W.; CASSELS, F. J. Intranasal immunization of BALB/c mice with enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor CS6 encapsulated in biodegradable poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres. **Vaccine**, vol. 24, p. 1359-1366, 2006.

CAIN, J. A.; DEEPE Jr., G. S. Interleukin-12 neutralization alters lung inflammation and leukocyte expression of CD80, CD86 and major histocompatibility complex class II in mice infected with *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.**, vol. 68 (4), p. 2069-2076, 2000.

CALICH, V. L.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, Dordrecht, vol. 66, p. 175-177, 1979.

CHAMPION, J. A.; WALKER, A.; MITRAGOTRI, S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. **Pharmaceutical Research.**, vol. 25 (8), p. 1815-1821, 2008.

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

DARLING, S. T. A protozoan general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necroses in the liver, spleen and lymph nodes. **JAMA**. vol. 46, p. 1283-1285, 1906.

DEEPE Jr., G. S.; DUROSE, G. G. Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.**, vol. 63, p. 3151-3157, 1995.

DEEPE Jr., G. S.; GIBBONS, R. S. Interleukins 17 and 23 influence the host

response to *Histoplasma capsulatum*. **J. Infect. Dis.**, vol. 200, p. 1-10, 2009.

DEEPE Jr., G. S.; GIBBONS, R. Protective efficacy of H antigen from *Histoplasma capsulatum* in a murine model of pulmonary histoplasmosis. **Infect. Immun.**, vol. 69, p. 3128-3134, 2001.

DEEPE Jr., G. S.; GIBBONS, R. S. T Cells require tumor necrosis factor- α to provide protective immunity in mice infected with *Histoplasma capsulatum*. **J. Infect. Dis.**, vol. 193 (2), p. 322-330, 2006.

DEEPE Jr., G. S.; GIBBONS, R.; WOODWARD, E. Neutralization of endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor subverts the protective immune response to *Histoplasma capsulatum*. **J. Immunol.**, vol. 163, p. 4985-4993, 1999.

DEEPE Jr, G. S. Immune response to early and late *Histoplasma capsulatum* infections. **Current Opinion in Microbiology**. vol. 3, p. 359-362, 2000.

DEEPE Jr., G. S.; McGUINNESS, M. Interleukin-1 and host control of pulmonary histoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, vol. 194 (6), p. 855-864, 2006.

DE MONBREUN, W. A. Cultivation and cultural characteristics of Darling's *Histoplasma capsulatum*. **Am. J. Trop. Med.** vol. 14, p. 93-125, 1934.

DEVCHAND, P. R.; KELLER, H.; PETERS, J. M.; VAZQUEZ, M.; GONZALEZ, F. J.; WAHLI, W. The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. **Nature.**, vol. 384, p. 39-43, 1996.

DING, T.; SUN, J.; ZHANG, P. Immune evaluation of biomaterials in TNF- α and IL-1 β at mRNA level. **J. Mater. Sci: Mater. Med.** vol. 18, p. 2233–2236, 2007.

DUARTE-ESCALANTE, E.; ZENTENO, E.; TAYLOR, M. L. Interaction of *Histoplasma capsulatum* yeasts with galactosylated surface molecules of murine macrophages. **Archives of Medical Research.**, vol. 34, p. 176-183, 2003.

FAISAL, S. M.; WEIWEI, Y.; McDONOUGH, S. P.; CHANG, Y. *Leptospira* immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. **Vaccine.** vol. 27, p. 378-387, 2009.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Histoplasmosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 42 (2), p. 192-198, 2009.

FENG, Li; QI, X. R.; ZHOU, X. J.; MAITANI, Y.; WANG, S. C.; JIANG, Y.; NAGAI, T. Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres. **J. Control. Release**, vol. 112, p. 35-42, 2006.

FISCHER, S.; SCHLOSSER, E.; MUELLER, M.; CSABA, N.; MERKLE, H. P.; GROETTRUP, M.; GANDER, B. Concomitant delivery of a CTL-restricted peptide antigen and CpG ODN by PLGA microparticles induces cellular immune response. **J. Drug Target.**, vol. 17 (8), p. 652–661, 2009.

FLAMAND, N.; MANCUSO, P.; SEREZANI, C. H. C.; BROCK, T. G. Leukotrienes: mediators that have been typecast as villains. **Cell. Mol. Life Sci.** vol. 64, p. 2657-2670, 2007.

FORD-HUTCHINSON, A. W.; BRAY, M. A.; DOIG, M. V.; SHIPLEY, M. E.; SMITH, M. J. H. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature.** vol. 286, p.

264-265, 1980.

GOMEZ, A. M.; RHODES, J. C.; DEEPE Jr., G. S. Antigenicity and immunogenicity of an extract from the cell wall and cell membrane of *Histoplasma capsulatum* yeast cells. **Infect. Immun.**, vol. 59, p. 330-336, 1991.

GÓMEZ, B. L.; FIGUEROA, J. I.; HAMILTON, J.; DIEZ, S.; ROJAS, M.; TOBÓN, A.; RESTREPO, A.; HAY, R. J. Detection of the 70-Kilodalton *Histoplasma capsulatum* antigen in serum of histoplasmosis patients: correlation between antigenemia and therapy during follow-up. **J. Clin. Microbiol.**, vol. 37, p. 675-680, 1999.

GOMEZ, F. J.; GOMEZ, A. M.; DEEPE Jr., G. S. An 80-kDa antigen from *Histoplasma capsulatum* that has homology to heat shock protein 70 induces cell mediated immune responses and protection in mice. **Infect. Immun.**, vol. 60, p. 2565-2571, 1992.

GOMPERTZ, O. F. et al. Micoses Sistêmicas. In: TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, p. 490-491, 2004.

GREEN, L. C.; RUIZ De LUZURIAGA, K.; WAGNER, D. A.; RAND, W.; ISTFAND, N.; YOUNG, V. R.; TANNENBAUN, S. R. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 78, p. 7764-7768, 1981.

GUPTA, R. K.; CHANG, A.-C.; GRIFFIN, P.; RIVERA, R.; GUO, Y.-Y.; SIBER, G. R. Determination of protein loading in biodegradable polymer microspheres containing tetanus toxoid. **Vaccine**. vol. 15 (6/7), p. 672-678, 1997.

HARIZI, H.; GUALDE, N. 5-Lipoxygenase pathway, dendritic cells, and adaptative immunity. **J. Biomed. Biotechnol.** vol. 2, p. 99-105, 2004.

HENINGER, E.; HOGAN, L. H.; KARMAN, J.; MACVILAY, S.; HILL, B.; WOODS, J. P.; SANDOR, M. Characterization of the *Histoplasma capsulatum*-induced granuloma. **J. Immunol.** vol. 177, p. 3303-3313, 2006.

HOLBROOK, E. D.; RAPPLEYE, C. A. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 11, p. 318–324, 2008.

JAGANATHAN, K. S.; VYAS, S. P. Strong systemic and mucosal immune responses to surface-modified PLGA microspheres containing recombinant Hepatitis B antigen administered intranasally. **Vaccine**. vol. 24, p. 4201-4211, 2006.

JONES, K. S. Biomaterials as vaccine adjuvants. **Biotechnol. Prog.** vol. 24, p. 807- 814, 2008.

JOHANSEN, P.; GANDER, B.; MERKLE, H. P.; SESARDIC, D. Ambiguities in the preclinical quality assessment of microparticulate vaccines. **TIBTECH** vol. 18, p. 203-211, 2000.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clin. Microbiol. Rev.** vol. 20 (1), p. 115-132, 2007.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis. **Clin. Chest Med.** vol. 30, p. 217-225, 2009.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** vol. 40 (3), 1998.

LIMA, K. M.; RODRIGUES Jr, J. M. Poly-DL-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system. **Braz. J. Med. Biol. Res.** vol. 32 (2), p. 171-180, 1999.

LIMA, K. M.; SANTOS, S. A.; LIMA, V. M.; COELHO-CASTELHO, A. A.; RODRIGUES Jr., J. M.; SILVA, C. L. Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial HSP-65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **Gene Ther.** vol. 10, p. 678-685, 2003.

LONG, K. H.; GOMEZ, F. J.; MORRIS, R. E.; NEWMAN, S. L. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. **J. Immunol.** vol. 170, p. 487-494, 2003.

MA, X.; TIAN, D.; XU, D.; YANG, D.; ZHU, H.; LIANG, Z.; ZHANG, Z. Uric acid enhances T cell immune responses to hepatitis B surface antigen-pulsed-dendritic cells in mice. **World J. Gastroenterol.** vol. 13 (7), p. 1060-1066, 2007.

MALYALA, P.; O' HAGAN, D.T.; SINGH, M. Enhancing the therapeutic efficacy of CpG oligonucleotides using biodegradable microparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.** vol. 61, p. 218-225, 2009.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.** vol. 25 (12), p. 677-686, 2004.

MEDEIROS, A. I.; SÁ-NUNES, A.; SOARES, E. G.; PERES, C. M.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infect. Immun.** vol. 72 (3), p. 1637-1644, 2004.

MEDEIROS, A. I.; SÁ-NUNES, A.; TURATO, W. M.; SECATTO, A.; FRANTZ, F. G.; SORGI, C. A.; SEREZANI, C. H.; DEEPE Jr, G. S.; FACCIOLI, L. H. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. **J. Immunol.** vol. 181, p. 8544-8551, 2008.

MEDEIROS, A. I.; SILVA, C. L.; MALHEIRO, A.; MAFFEI, C. M. L.; FACCIOLI, L. H. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the β -glucan present in their cell wall. **Br. J. Pharmacol.** vol. 128, p. 1529-1537, 1999.

MEN, Y.; AUDRAN, R.; THOMASIN, C.; EBERL, G.; DEMOTZ, S.; MERKLE, H.; GANDER, B.; CORRADIN, G. MHC class I- and class II-restricted processing and presentation of microencapsulated antigens. **Vaccine**, vol. 17, p. 1047-1056, 1999.

MEN, Y.; THOMASIN, C.; MERKLE, H. P.; GANDER, B.; CORRADIN, G. A single administration of tetanus toxoid in biodegradable microspheres elicits T cell and antibody responses similar or superior to those obtained with aluminum hydroxide. **Vaccine**, vol. 13 (7), p. 683-689, 1995.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **J. Leukoc. Biol.** vol. 73, p. 209-212, 2003.

NARALA, V. R.; ADAPALA, R. K.; SURESH, M. V.; BROCK, T. G.; PETERS-GOLDEN, M.; REDDY, R. C. Leukotriene B₄ is a physiologically relevant endogenous peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist. **J. Biol. Chem.** *In press*, 2010.

NEWMAN, S. L. Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*. **Trends Microbiol.** vol. 7 (2), p. 67-71, 1999.

NICOLETE, R.; LIMA, K. M.; RODRIGUES Jr., J. M.; BARUFFI, M. D.; MEDEIROS, A. I.; BENTLEY, M. V. L. B.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. *In vitro* e *in vivo* activities of leukotrienes B₄-loaded biodegradable microspheres. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** vol. 83, p. 121-129, 2007.

NICOLETE, R.; RIUS, C.; PIQUERAS, L.; JOSE, P. J.; SORGI, C. A.; SOARES, E. G.; SANZ, M. J.; FACCIOLI, L. H. Leukotriene B₄-loaded microspheres: a new therapeutic strategy to modulate cell activation. **BMC Immunol.** vol. 9, p. 1-11, 2008.

O'HAGAN, D. T.; SINGH, M.; GUPTA, R. K. Poly (lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. **Adv. Drug Del. Rev.** vol. 32, p. 225-246, 1998.

PAGLIARI, L. J.; PERLMAN, H.; LIU, H.; POPE, R. M. Macrophages require constitutive NF- κ B activation to maintain A1 expression and mitochondrial homeostasis. **Mol Cell. Biol.** vol. 20 (23), p. 8855-8865, 2000.

PANJWANI, N. N.; POPOVA, L.; SRIVASTAVA, P. K. Heat Shock Proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. **J. Immunol.** vol. 168, p. 2997-3003, 2002.

PERKINS, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. **Nat. Rev. Mol. Cell Bio.** vol. 8, p. 49-62, 2007.

PETERS-GOLDEN, M. Molecular mechanisms of leukotriene synthesis: the changing paradigm. **Clinical and Experimental Allergy.** vol. 28, p. 1059-1065, 1998.

PETERS-GOLDEN, M.; CANETTI, C.; MANCUSO, P.; COFFEY, M. J. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. **J. Immunol.** vol. 173, p. 589-594, 2004.

RACOOSIN, E. L.; SWANSON, J. A. Macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages. **J. Exp. Med.** vol. 170 (5), p. 1635-1648, 1989.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat. Rev. Immunol.** vol. 4, p. 1-13, 2004.

SÁ-NUNES, A.; MEDEIROS, A. I.; NICOLETE, R.; FRANTZ, F. G.; PANUNTO-CASTELO, A.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. Efficacy of cell-free antigens in evaluating cell immunity and inducing protection in a murine model of histoplasmosis. **Microbes Infect.** vol. 7, p. 584-592, 2005.

SCHLOSSER, E.; MUELLER, M.; FISCHER, S.; BASTA, S.; BUSCH, D. H.; GANDER, B.; GROETTRUP, M. TLR ligands and antigen need to be coencapsulated into the same biodegradable microsphere for the generation of potent cytotoxic T lymphocyte responses. **Vaccine** vol. 26, p. 1626-1637, 2008.

SECATTO, A. Dissertação de Mestrado: “Leucotrienos na resposta imune inata e adaptativa. Modelo experimental de histoplasmose pulmonar”. Jan. 2008.

SINHA, V. R.; TREHAN, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. **J. Control. Release**, vol. 90, p. 261-280, 2003.

STIER, E. M.; MANDAL, M.; LEE, K. Differential cytosolic delivery and presentation of antigen by listeriolysin O-liposomes to macrophages and dendritic cells. **Molecular Pharmaceutics**, vol. 2 (1), p. 74-82, 2005.

TROMBONE, A. P. F.; SILVA, C. L.; ALMEIDA, L. P.; ROSADA, R. S.; LIMA, K. M.; OLIVER, C.; JAMUR, M. C.; COELHO-CASTELO, A. A. M. Tissue distribution of DNA-HSP65/TDM-loaded PLGA microspheres and uptake by phagocytic cells. **Genetic Vaccines and Therapy**. vol. 5 (9), p. 1-8, 2007.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu. Rev. Immunol.** vol. 20, p. 825-852, 2002.

VABULAS, R. M.; AHMAD-NEJAD, P.; GHOSE, S.; KIRSCHNING, C. J.; ISSELS, R. D.; WAGNER, H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/Interleukin-1 receptor signal pathway. **The Journal of Biological Chemistry**. vol. 277 (17), p. 15107-15112, 2002.

WHEAT, L. J. Histoplasmosis: a review for clinicians from non-endemic areas. **Mycoses**, vol. 49, p. 274-282, 2006.

WOODS, J. P. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis and responsiveness to its environment. **Fungal Genet. Biol.**, vol. 35, p. 81-97, 2002.

WRIGHT, S. D.; SILVERSTEIN, S. C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **J. Exp. Med.**, vol. 158 (6), p. 2016-2023, 1983.

WYMAN, M. P.; SCHNEITER, R. Lipid signalling in disease. **Nat. Rev. Mol. Cel. Biol.**, vol. 9, p. 162-176, 2008.

YOSHIDA, M.; MATA, J.; BABENSEE, J. E. Effect of poly (lactic-co-glycolic acid) contact on maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. **J. Biomed. Mater. Res. A** vol. 80 (1), p. 7-12, 2007.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA R. *et al.* Histoplasmose. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, Guanabara – Koogan, 2005.

ZHOU, P.; SIEVE, M. C.; BENNETT, J.; KWON-CHUNG, K. J.; TEWARI, R. P.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A.; SEDER, R. A. IL-12 prevents mortality in mice infected with *Histoplasma capsulatum* through induction of IFN- γ . **J. Immunol.** vol. 155, p. 785-795, 1995.

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps

Characterization and *in vitro* activities of cell-free antigens from *Histoplasma capsulatum*-loaded biodegradable microspheres

Daiane F. dos Santos^a, Roberto Nicolete^a, Patrícia R.M. de Souza^b, Cláudia da S. Bitencourt^a, Rubens R. dos Santos Junior^b, Vânia L.D. Bonato^b, Célio L. Silva^b, Lúcia H. Faccioli^{a,*}

^a Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2009

Received in revised form

20 September 2009

Accepted 4 October 2009

Available online 13 October 2009

Keywords:

Cell-free antigens

Biodegradable microspheres

Phagocytosis

Macrophages

Cell activation

ABSTRACT

In the last decades, the incidence of histoplasmosis, a pulmonary fungal disease caused by *Histoplasma capsulatum*, has increased worldwide. In this context, vaccines for the prevention of this infection or therapies are necessary. Cell-free antigens (CFAs) from *H. capsulatum* when administered for murine immunization purposes are able to confer protection and control of the infection, since they activate cellular immunity. However, the most of vaccination procedures need several antigens administrations and immunoadjuvants, which are not approved for use in humans. The aim of this study was to develop and characterize a vaccination approach using biodegradable PLGA microspheres (MS) that could allow the controlled and/or sustained release of the encapsulated antigens from *H. capsulatum*. CFAs-loaded MS presented a size less than 10 µm, were marked engulfed by bone marrow-derived macrophages (BMDMΦ) and induced the nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) production by these cells. Our data show that CFAs-loaded MS induce cell activation, suggesting an immunostimulant effect to be further investigated during immunization procedures. CFAs-loaded MS present potential to be used as vaccine in order to confer protection against *H. capsulatum* infection.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Histoplasma capsulatum is a dimorphic pathogenic fungus that causes a pulmonary disease characterized by chronic granulomatous and suppurative inflammatory reactions (Cano and Hajjeh, 2001; Woods, 2002). Resistance to *H. capsulatum* is dependent on cellular immunity mediated by T cells and macrophages (Wüthrich et al., 2003) and also leukotrienes (LTs) production (Medeiros et al., 2004). In the last decades, the incidence of histoplasmosis has increased worldwide, mainly as a result of the immunological alterations involved with deficiency of the cellular immunity (Woods,

2002; Wheat, 2006). In this context, vaccines for the prevention or treatment of this fungal infection have been investigated. Gomez et al. (1991) carried out a series of studies to identify protective immunogens from *H. capsulatum* for vaccine development. These studies have shown that the extract of cell wall and cell membrane (CW/M) of the yeast phase, the isolated proteins HIS-62 and HIS-80, which are homologous to heat shock proteins 60 and 70, respectively (Gomez et al., 1991, 1992) and the recombinant H antigen (Deepe and Durose, 1995; Deepe and Gibbons, 2001) are promising antigens. Sá-Nunes et al. (2005) showed that CFAs from *H. capsulatum* induced a potent delayed-type hypersensitivity (DTH) response in infected mice, reflecting the degree of immunity developed by the mice. Also, CFAs activated *in vitro* *H. capsulatum*-specific cells to produce IFN-γ, an essential cytokine for protective immunity, over a long period. Finally, the immunization with CFAs was able to protect mice against a lethal inoculum of *H. capsulatum* and significantly to reduce fungal burden in the lungs and spleens of the infected mice. Thus, CFAs when employed for animals' immunization can confer efficient protection and control of the infection, since they activate the cellular immunity. Furthermore, the protection of CFAs-immunized mice was associated with increased LTB₄

Abbreviations: CFAs, cell-free antigens; LT, leukotrienes; MS, microspheres; BMDMΦ, bone marrow-derived macrophages; LPS, lipopolysaccharide; FBS, foetal bovine serum; mAbs, monoclonal antibodies; PLGA, poly(D,L-lactide-co-glycolide); PVA, poly(vinyl-alcohol); LAL, *Limulus* Amoebocyte lysate; PBS, phosphate buffer solution; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; M-CSF, monocyte-colony stimulant factor; NO, nitric oxide; TNF-α, tumor necrosis factor-α.

* Corresponding author. Tel.: +55 16 36024303; fax: +55 16 36024725.

E-mail address: faccioli@fcrp.usp.br (L.H. Faccioli).

0928-0987/\$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ejps.2009.10.003

generation, inflammatory mediators production, as well as generation and recruitment of memory T cells to the lungs (Medeiros et al., 2008).

Successful vaccination techniques stimulate immunity or protection with minimal number of administrations (Johansen et al., 2000). In addition to this, a wide variety of immunoadjuvants used to improve the immune response has been investigated, but most of them are not approved for use in humans. This fact has provided the development of many vaccine-delivery approaches (Lima and Rodrigues, 1999). Biodegradable polymer systems allow the sustained and/or controlled release of the encapsulated substances (Eldridge et al., 1991; Lima and Rodrigues, 1999). Studies have shown that systems for controlling the release of antigens can increase specific immunity by selectively driving an antigen or gene vector to immune effectors cells (Lima et al., 2003). Also, Nicolette et al. (2007) showed that biodegradable MS based on PLGA containing LTB₄ were able to confer protection to the encapsulated lipid mediator, provoked greater uptake by peritoneal macrophages and also they were able to induce a different type of cell activation compared to LTB₄ in solution form (Nicolette et al., 2008).

The encapsulation of different antigens in MS has been able to elicit both cellular and humoral immune responses. Studies have shown that a single injection of tetanus toxoid-loaded MS elicits T cell and antibody responses similar or higher than those obtained with aluminum hydroxide (Men et al., 1995). Recombinant hepatitis B surface antigen (HBsAg) was successfully loaded into the PLGA MS, and the single subcutaneous injection of HBsAg-loaded MS in mice resulted in comparable serum antibody titers to those of three injections of the conventional aluminum adjuvant formulated HBsAg vaccine (Feng et al., 2006). Similarly, Faisal et al. (2009) showed that the microencapsulation of an antigen derived from *Leptospira* was able to confer a much better protection to the infection in comparison to association of the antigen with aluminum hydroxide. Moreover, PLGA MS have been used on the co-encapsulation of TLR agonists, such as oligonucleotides CpG (CpG ODN) and antigens in order to induce potent responses of cytotoxic T cells (CTLs) (Malyala et al., 2009; Fischer et al., 2009; Schlosser et al., 2008).

In this context, the aim of this study was to develop and characterize biodegradable PLGA MS containing CFAs from cell wall of *H. capsulatum* for future immunization purposes. The MS were evaluated as the size, zeta potential and morphology. We also determined the encapsulation efficiency and *in vitro* cumulative release of CFAs from the MS. Employing CFAs-loaded MS, we evaluated the phagocytosis assay, NO and TNF- α production by BMDM ϕ as a measurement of cell activation.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Young adult (8 weeks old) sv129 mice were obtained from Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil and maintained under standard laboratory conditions. All experiments were approved by and conducted in accordance with the guidelines established by the Animal Care Committee of the University (08.1.382.53.0).

2.2. Materials

For the purposes of this study, LPS of *Escherichia coli* (serotype 0127:B8), Griess reagent mixtures and 6-coumarin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) with a co-monomer ratio of 50:50 (lactic/glycolic acid) and molecular weight of 78 kDa was obtained from

Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). Poly(vinyl-alcohol) (Mowiol 40–88) was obtained from Aldrich Chemicals (Waukee, WI, USA). Methylene dichloride and acetonitrile were purchased from Merck (Dietikon, Switzerland). Materials for SDS-PAGE were purchased to Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA) and the silver staining kit protein was from GE Healthcare Bio-Sciences AB (Sweden). Acqua Poly/Mount was obtained from Polysciences, Inc. (Warrington, PA). Panoptic staining was from Laborclin (Paraná, Brazil). For the detection of endotoxin in formulations a *Limulus* Amoebocyte Lysate test (LAL test, QCL-1000, Bio Whittaker, CAM-BREX Company, Walkersville, MD, USA) was used. Protein content was estimated using a Coomassie Protein Assay Reagent Kit from Pierce (Rockford, IL, USA). RPMI-1640 medium, FBS and antibiotics (penicillin and gentamicin) were from Gibco (Grand Island, NY, USA). For cell cultures, non-tissue culture treated plates from Becton Dickinson (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) were used. In the analysis of flow cytometry, the mAbs specific for F4/80 coupled to allophycocyanin (APC) and anti-CD16/CD32 were purchased from BD (San Diego, CA, USA). Commercially enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) antibodies were used to measure TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.3. CFAs preparation

CFAs were produced according to Sá-Nunes et al. (2005). Briefly, about 300 mg of *H. capsulatum* yeast grown on BHI-agar-blood slants were collected and suspended in 1 ml of PBS (0.15 M, pH 7.4), mixed for 60 s on a vortex-mixer and centrifuged at 10,000 $\times g$ for 60 s. The supernatant fluid was collected and the procedure was repeated. This supernatant was filtrated, and its protein content was estimated using a Coomassie Protein Assay Reagent Kit, and albumin standard curves prepared according to the manufacturer's instructions.

2.4. MS preparation

MS containing CFAs from *H. capsulatum* were prepared using the double emulsion/solvent evaporation method, as previously described with some modifications (Nicolette et al., 2008; Trombone et al., 2007). Briefly, 10 ml of methylene dichloride containing 120 mg of polymer (PLGA 50:50) were emulsified with 0.3 ml of inner aqueous phase containing CFAs (100 $\mu g/ml$ solution), using a T25 Ultraturrax homogenizer (IKA, Labortechnik, Germany) to produce a primary water-in-oil emulsion. This emulsion was then mixed with 20 ml of an external aqueous phase containing surfactant (PVA at 3%, w/v), in order to form a stable water-in-oil-in-water emulsion. The mixture was stirred for 4 h in RW20n homogenizer (IKA, Labortechnik, Germany) for solvent evaporation. MS were collected and washed three times with distilled and sterile water and freeze-dried until the use. Unloaded MS were prepared at the same conditions. Fluorescent-labeled MS were prepared by adding 6-coumarin (green fluorescence; Sigma–Aldrich) to the organic phase. The amount of 6-coumarin/mg polymer was at dose of 0.15 μg (Trombone et al., 2007).

2.5. MS characterization

2.5.1. Size, zeta potential and morphology

Particles diameters were characterized using a particle size analyzer (LS 13 320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer; Beckman Coulter, USA). Samples were dispersed in distilled water (0.4 ml) and analyzed at 25 °C. Zeta potential analysis of the MS was performed using a Nano Zeta Sizer (Malvern instruments, England) under the same condition described above. To determine whether the MS were contaminated by LPS, a LAL test was performed. The

shape and surface of the dried microparticles were observed by scanning electron microscopy (SEM), using a ZEISS scanning microscope (ZEISS, Evo 50, Cambridge, England).

2.5.2. Encapsulation efficiency and *in vitro* release study

The encapsulation efficiency of CFAs was determined after addition of 0.6 ml of acetonitrile in 10 mg of MS. The sample was maintained in vortex until the complete solubilization of the MS, submitted to a period of evaporation (overnight) and then, the pellet was resuspended in 2 ml of deionized water. This procedure was adopted since concentrations above 10% of acetonitrile can positively interfere in the assay using Coomassie reagent, as described in the manufacturer's instructions. CFAs content was assessed by using the Coomassie reagent with CFAs standard curves. Absorbance was determined in a ELISA reader (960, Metertech) at 595 nm. Sample values were calculated based on the equation obtained from the calibration curve: $y = 0.01820x + 0.01163$; $r^2 = 0.9859$, where y is the absorbance, x is the CFA concentration ($\mu\text{g/ml}$), and r is the coefficient of determination. In order to calculate the percentage of CFAs entrapped in the MS the following formula was used:

$$\frac{\text{total amount of CFAs detected in MS} \times 100}{\text{total amount of CFAs theoretically associated with MS}}$$

For *in vitro* release study, CFAs-loaded MS (10 mg) were suspended in 1 ml of PBS (0.15 M), pH 7.4 and incubated at 37 °C under constant agitation at 150 rpm. In pre-established time intervals, samples of the supernatant (0.1 ml) were collected and centrifuged (10,000 $\times$ g, 5 min). An equal volume of fresh buffer (PBS) was replaced. The protein concentration in the supernatant was determined by using the Coomassie reagent with CFAs standard curves, as described above.

2.5.3. Integrity of CFAs released from MS

In order to confirm the integrity of CFAs after microencapsulation process, the proteins extracted from the PLGA MS were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The CFAs-loaded MS were dissolved in 0.6 ml of acetonitrile and the CFAs were extracted with 2 ml of deionized water, as described above. The aqueous layers were concentrated by speed vacuum (Concentrator Plus Eppendorf, São Paulo, SP, Brazil). For SDS-PAGE analysis, the samples of native CFAs and concentrated antigens extracted from the CFAs-MS were suspended in Tris-HCl, glycerol, SDS and mercaptoethanol, loaded onto 5% stacking gel and subjected to electrophoresis on a 12% separation gel at 10 mA, 200 V (Sá-Nunes et al., 2005). After running, the gel was stained with silver. Proteins with known molecular mass (MM) were used as standards.

2.6. Cell culture

Bone marrow from femurs and tibias of sv129 mice was plated on day 0 in a 24-well plate at 1.0×10^6 cells/ml in RPMI-1640 complete medium containing 20% FBS, 30% culture supernatant L-929 (clone 929 of strain L, ATCC: CCL1) and antibiotics (10 $\mu\text{l/ml}$ penicillin and 1 $\mu\text{l/ml}$ gentamicin). On day 3, an equal volume of RPMI medium was added. On day 6, one half of the volume of RPMI medium was replaced. On final of differentiation stage of macrophages, 1.0×10^6 cells were removed with ice-cold PBS for analysis by flow cytometry as expression of the F4/80 (phenotype of the macrophages) on the cell surface (Austyn and Gordon, 1981). The cell suspensions (1.0×10^6 cells/ml) were preincubated with anti-CD16/CD32 (Fc Block) during 40 min at room temperature. Then, these cells were incubated with APC labeled mAb for F4/80 during 30 min at room temperature. The cells were washed with

PBS containing 2% FBS, resuspended in PBS containing 1% formaldehyde and analyzed by flow cytometry. Analytical flow cytometry was performed using a FACSCanto (Becton Dickinson, USA) and the data were analyzed using the FACSDiva software (Becton Dickinson, USA). The results are presented as adjusted percentages, i.e., the background from the appropriate isotype controls was subtracted from the positive percentage.

2.7. Uptake of MS by bone marrow-derived macrophages

On day 7, BMDM ϕ (1×10^6 /24-well), were incubated for 4 h with 1 mg/ml of unloaded MS or CFAs-loaded MS. After incubation period, medium was aspirated and non-ingested MS were washed off with additional medium. Cell suspensions were collected, cyto-centrifuged and identified by panoptic staining (Nicolette et al., 2007). MS uptake was assessed microscopically by counting the percentage of BMDM ϕ that had ingested at least one MS. The phagocytic index (PI) was also calculated: PI = number of engulfed MS $\times$ number of BMDM ϕ containing at least one MS/total number of BMDM ϕ .

2.8. Scanning confocal laser microscopy

BMDM ϕ (5×10^5 cells/24-well) were plated on wells containing coverslips and co-incubated with 1 mg/ml of fluorescent MS (unloaded or CFAs-loaded MS) during 4 h. After this incubation period, the cells were washed twice with PBS, fixed for 15 min with paraformaldehyde/PBS (2%, v/v) and rinsed in PBS. Coverslips were mounted using Acqua Poly/Mount (Polysciences) and examined by confocal microscopy (Leica TCS SP5 AOBs-Leitz, Mannheim, Germany).

2.9. NO and TNF- α production by bone marrow-derived macrophages

NO production by murine BMDM ϕ was determined by Griess reaction (Green et al., 1981). BMDM ϕ were incubated for 24 h with unloaded or CFAs-loaded MS, CFAs in solution form (50 $\mu\text{g/ml}$) and LPS (500 ng/ml) (used as positive control). Only medium was used as negative control. Supernatants (0.1 ml) were incubated with an equal volume of Griess reagent mixtures (1% sulfanilamine, 0.1% N-(1-naphtyl)-ethylenediamine dihydrochloride, 2.5% H_3PO_4) at room temperature for 10 min. The absorbance was measured in a microplate reader at 540 nm and concentrations calculated from a sodium nitrite standard curve. Data are presented as micromoles of NO_2^- (nitrite) (mean $\pm$ S.E.M.).

In order to evaluate the TNF- α production, BMDM ϕ were incubated for 24 h with the same stimuli described above. TNF- α was measured by ELISA using commercially available antibodies with reference standard curves. The optical density of samples was determined at 450 nm in a microplate reader. Sensitivities were >8.0 pg/ml.

2.10. Statistical analysis

The data are presented as mean $\pm$ S.E.M. and analyzed using unpaired *t*-test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Size, zeta potential and surface morphology

Lyophilized microparticles were dispersed in distilled water and submitted to analysis of size distribution. The average diameter was

Fig. 1. (A) Size distribution of unloaded MS. Mean particle size: $6.6 \pm 3.9 \mu\text{m}$. (B) Size distribution of CFAGs-loaded MS. Mean particle size: $7.6 \pm 3.7 \mu\text{m}$.

$6.6 \pm 3.9 \mu\text{m}$ (Fig. 1A) and $7.6 \pm 3.7 \mu\text{m}$ (Fig. 1B), for unloaded and CFAGs-loaded MS, respectively. In order to evaluate if the encapsulated CFAGs would alter the ionic profile of the polymer, particles were submitted to the analysis of zeta potential. The average zeta potential was $-29.9 \pm 7.3 \text{ mV}$ and $-23.9 \pm 6.2 \text{ mV}$, for unloaded and CFAGs-loaded MS, respectively. Scanning electron microographies of MS are shown in Fig. 2. The unloaded and CFAGs-loaded MS were spherical with smooth surface. The MS formulations were also assayed for detection of endotoxin activity using the *Limulus* Amoebocyte assay (LAL test). Endotoxin activity in all MS batches was lower than $0.1 \text{ EU}/\mu\text{g}$. According to the European Pharmacopoeia, the safety level for endovenous administration is $5 \text{ EU}/\text{kg}/\text{h}$.

3.2. Encapsulation efficiency and in vitro release of CFAGs

CFAGs content after complete solubilization of the MS was determined by the Coomassie protein assay. The amount of CFAGs was found to be $0.37 \mu\text{g}/\text{mg}$ of MS. This value represents an encapsulation efficiency of 44.3%. The *in vitro* release profiles of CFAGs entrapped into PLGA MS were evaluated for up to 14 days (336 h) (Fig. 3). The results showed a burst effect in which the release of the entrapped protein reached approximately 50% after 4 h. Thereafter, the protein release is stopped and a constant release profile is achieved. The variability of data points (representative of two batches) can be due to the difficulty to establish a precise protein measurement of each time interval collected.

3.3. Integrity of CFAGs released from MS

The effect of the microencapsulation process by the solvent evaporation method on the structural integrity of the CFAGs was investigated using SDS-PAGE. Fig. 4 (lane B) shows that the integrity of two protein bands extracted from MS was preserved in all the tested formulations. It is worth to point out that the detected protein of 80 kDa (homologous to the HSP-70) is considered immunogenic, since it showed efficacy in the protection against murine pulmonary histoplasmosis and also capacity for stimulating the cellular immune response to the *H. capsulatum* (Gomez et al., 1991, 1992).

Fig. 2. (A) Unloaded and (B) CFAGs-loaded MS morphologies assessed by scanning electronic microscopy (SEM).

3.4. Efficient uptake of the CFAGs-loaded MS by BMDMφ

Flow cytometry analysis showed that 75.3% of the cells differentiated from bone marrow had F4/80 expression on their surface. BMDMφ (F4/80⁺) were incubated with unloaded or CFAGs-loaded MS during 4 h at 37°C . The uptake assay was evaluated through of the percentage of cells that ingested at least one MS and the phagocytic index ($\text{PI} = \text{number of engulfed MS} \times \text{number of BMDM}\phi$ containing at least one MS / total number of BMDMφ). The assay revealed a greater number of cells that ingested at least one MS containing CFAGs ($64 \pm 5\%$) when compared with those incubated with unloaded MS ($32 \pm 4\%$) (Fig. 5A). No particle uptake was observed at 4°C (data not shown). BMDMφ presented a greater phagocytic index when incubated with CFAGs-loaded MS (122 ± 39) than unloaded MS (25 ± 4) (Fig. 5B). Fig. 6A and B shows, respectively,

Fig. 3. *In vitro* cumulative release of CFAGs from PLGA MS in PBS (0.15 M), pH 7.4; data are representative of two batches.

Fig. 4. Integrity of CFAs released from MS. SDS-PAGE analysis of CFAs (lane A) and CFAs obtained from CFAs-loaded MS (lane B) with a 12% polyacrylamide gel stained with silver. MM markers (Da) are depicted on the left of the gel.

the unloaded and CFAs-loaded MS uptake by BMDM ϕ at 37 °C, after 4 h of incubation.

The presence of MS inside the BMDM ϕ was also evaluated by scanning confocal laser microscopy. BMDM ϕ were incubated with fluorescent unloaded or CFAs-loaded MS during 4 h at 37 °C. It was observed a greater number of fluorescent CFAs-loaded MS (Fig. 6D) engulfed by the cells than fluorescent unloaded MS (Fig. 6C).

3.5. Engulfed CFAs-loaded MS induce NO and TNF- α production by BMDM ϕ

Production of NO and TNF- α by the macrophages was evaluated as a measurement of cell activation. The CFAs-loaded MS induced greater concentrations of nitrite ($1.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$) when compared with cells without stimulus ($0.14 \pm 0.01 \mu\text{M}$) and incubated with unloaded MS ($0.6 \pm 0.05 \mu\text{M}$) or CFAs in solution form ($0.2 \pm 0.02 \mu\text{M}$) (Fig. 7A). BMDM ϕ stimulated with unloaded MS also produced significant amounts of nitrite when compared with cells without stimulus. LPS used as positive control presented its expected effect. The TNF- α production by BMDM ϕ after 24 h incubation was determined by ELISA. CFAs-loaded MS induced significant release of TNF- α ($149 \pm 16 \text{ pg/ml}$) compared with medium ($23 \pm 14 \text{ pg/ml}$), unloaded MS ($54 \pm 9 \text{ pg/ml}$) or CFAs in solution form ($13 \pm 6 \text{ pg/ml}$) (Fig. 7B). Unloaded MS or CFAs in solution form did not induce statistically significant cytokine

Fig. 5. (A) Uptake of unloaded and CFAs-loaded MS by BMDM ϕ after 4 h incubation. Data are expressed in percentage of BMDM ϕ that engulfed at least one MS. (B) For this uptake assay, the phagocytic index was calculated: PI = number of engulfed MS $\times$ number of BMDM ϕ containing at least one MS/total number of BMDM ϕ . Results are presented as mean $\pm$ S.E.M. from three experiments ($n=3$); * $P<0.05$ and *** $P<0.001$, relative to values in the control group (unloaded MS).

release. LPS used as positive control induced high release of TNF- α ($1.62 \pm 220 \text{ pg/ml}$).

4. Discussion

During the last years, studies employing biodegradable polymer systems, which allow the sustained and/or controlled release of a great range of substances, especially antigens, are becoming useful tools to efficiently activate the immune response during immunizations. In this study, biodegradable MS containing CFAs from *H. capsulatum* had their diameters, zeta potential, morphology and protein integrity characterized. A double emulsion/solvent evaporation method was chosen to prepare the particles based on the major protein content of CFAs. The mean of particles size achieved was $7.6 \mu\text{m}$ (Fig. 1B) and 72.4% of MS had diameter less than $10 \mu\text{m}$. It was adequate for phagocytosis assay, since BMDM ϕ efficiently engulfed these MS. *In vitro* studies have shown that microparticles having less than $10 \mu\text{m}$ are efficiently internalized by macrophages (Champion et al., 2008). Moreover, *in vivo* studies related to immunizations suggest that diameters greater than $10 \mu\text{m}$ increase the microparticles deposition at the site of injection, allowing the antigen persistency and MS escape from phagocytic cells (Johansen et al., 2000; Lima and Rodrigues, 1999). In this context, well-characterized microparticulate systems gain importance to predict the better doses for antigens release during immunization procedures.

In this study, the polymer used to prepare the MS (PLGA) does not cause tissue injury since it is inert and biodegradable (Bazile et al., 1992). These features will allow an appropriate administration of CFAs-loaded PLGA MS to mice during immunizations. Our results show that CFAs-loaded MS had no significant changes in the zeta potential or morphology when compared with unloaded

Fig. 6. (A and B) Light micrographs of BMDMφ, which had ingested unloaded and CFAGs-loaded MS, respectively. Cells were identified after panoptic staining. Magnification: 100×/1.25 oil. (C and D) Confocal images of BMDMφ containing fluorescent unloaded and CFAGs-loaded MS, respectively. The black arrows show the engulfed MS.

ones. Although few and discreet irregularities on the particles shape could be achieved (Fig. 2B), this fact can be due to the attachment of CFAGs on particles surface and/or to the exposure time of the electric tension applied for the acquisition of the images. This procedure was adopted in order to get better magnifications. The analysis of MS zeta potential was evaluated in order to verify if the encapsulation of proteins (CFAGs) could modify the negative electric load of the polymer. Our results suggest that the constituents of CFAGs (glycoproteins, i.e.) can donate positive charge to the polymer surface, provoking a change in the electric load of the particle. In this context, since the cell membrane has negative polarity, the increase of positive charge on the MS surface as presented by CFAGs-loaded MS would allow better uptake of the particles by the cells.

In polymeric microparticulate systems, the precise measurement of encapsulated contents is a critical step and the quantity of encapsulated protein depends on the method of preparation and also the structural features of itself. Most of the methods employed to determine the encapsulation efficiency are based on the digestion of the polymer with NaOH/SDS solution (Feng et al., 2006; Gupta et al., 1997) or extraction of the released content with PBS after the dissolution employing organic solvents (Gupta et al., 1997). In this context, other authors also suggest that is difficult to achieve a precise method for protein quantification after microencapsulation (Johansen et al., 2000). In this study, we determined the encapsulation efficiency of CFAGs by the Coomassie protein assay. Employing this method, we adopted a careful procedure to minimize possible interference between acetonitrile (used for dissolving MS) and the Coomassie reagent, as described in the section 2.5.2. Our results showed that the encapsulation rate achieved was considered efficient (44.3%).

The microencapsulation process may lead to the destabilization and aggregation of the encapsulated proteins, affecting their immunogenicity. The integrity of the CFAGs extracted from MS was investigated using SDS-PAGE. It was not observed degradation for the protein with 80 kDa (homologous to the HSP-70 and considered immunogenic), which can stimulate the cellular immune response to the *H. capsulatum* (Gomez et al., 1991, 1992) (Fig. 4, lane B). Although the other protein band detected (approximately 70 kDa) does not have the same property, it is also present in the serum of patients with histoplasmosis (Gómez et al., 1999).

In vitro release studies demonstrated a sustained release of CFAGs over a period of days with a burst effect until 4 h (Fig. 3). Total release of CFAGs is dependent on particle degradation, which may account for the effects observed. Nevertheless, the remaining 45–50% of the encapsulated CFAGs could be released over a longer period of time. Also, this release profile can be due to the amount of CFAGs attached on the particles surface, since the non-encapsulated protein can be released to the medium promptly over the time, especially when PBS at high concentration is used as buffer. Regarding this assay, the variability of data points can be also due to possible alterations in the concentration of PBS during the assay (evaporation process, i.e.). This fact could interfere with the protein detection of the samples. This assay provided evidence that CFAGs-loaded MS were able to confer a constant and sustained release of the contents during the evaluated period. This fact may constitute a good strategy for further immunization, since the CFAGs were released until 14 days at good scores (~45%). Studies involving protein encapsulation in PLGA MS have shown that the release profiles are related to the polymer porosity, degradation and also to the particles diameter (Feng et al., 2006; Sinha and Trehan, 2003; Lima and Rodrigues, 1999).

Fig. 7. (A) NO and (B) TNF- α production by BMDM ϕ (1.0×10^5 cells) after 24 h of incubation without stimulus, with 1 mg/ml of unloaded or CFAGs-loaded MS and CFAGs in solution form (50 μ g/ml). LPS (500 ng/ml) was used as positive control. NO $_2^-$ and TNF- α concentrations in the supernatants of BMDM ϕ culture were quantified by Griess reaction and ELISA, respectively. (A) Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 6$); *** $P < 0.01$ and **** $P < 0.001$, values compared to medium. ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.001$, CFAGs-loaded MS compared to unloaded MS and CFAGs in solution form, respectively. (B) Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 6$); $P < 0.001$, *** values compared to medium; **** and *****, CFAGs-loaded MS compared to unloaded MS and CFAGs in solution form, respectively.

As previously described (Champion et al., 2008), the MS size is critical during the uptake process by macrophages. Particles with a mean diameter (5–6 μ m) can efficiently interact with the membrane ruffles present on the macrophages surface. In this regard, our results showed that a great number of smaller particles could be seen inside the cells after 4 h incubation (Fig. 6D). Moreover, CFAGs-loaded MS induced a great increase in the phagocytic index when compared with unloaded MS (Fig. 5B). We can infer that CFAGs released from the smaller engulfed particles were able to modulate the phagocytic ability of the macrophages and this fact can be due to the particles' size and also to the high releasing rates of CFAGs until 4 h (Fig. 3). In order to get more conclusive data about the activation of macrophages by the MS, we measure the NO and TNF- α production after the MS uptake by BMDM ϕ . CFAGs-loaded MS could provoke significant increase in nitrites and TNF- α concentrations produced by BMDM ϕ (Fig. 7A and B, respectively). The increased production of these mediators suggests that the CFAGs released from MS were able to induce cell activation. It is a fact that macrophages can produce NO and inflammatory cytokines during phagocytosis process and cell activation (Underhill and Ozinsky, 2002). Since NO and TNF- α production are necessary to confer pro-

tection against the infection by *H. capsulatum* (Deepe and Gibbons, 2006), the CFAGs-loaded MS prepared by our method can be used for immunization purposes.

In summary, in the present study, we have developed CFAGs-loaded biodegradable MS using a double emulsion/solvent evaporation process. This system allowed obtaining an appropriate encapsulation and good entrapment efficiency, and also preserved CFAGs bioactivity, since they induced significant release of NO and TNF- α after the MS uptake by BMDM ϕ . The proposed formulation could be used to activate macrophages by enhancing the phagocytosis and inflammatory mediators release during immunization procedures. The findings achieved in this study suggest that CFAGs-loaded biodegradable MS could be a good approach for vaccination against histoplasmosis.

Acknowledgments

The authors thank Carlos A. Sorgi, Érika V. G. Sousa, José O. Del Ciampo, Henrique Diniz, Ana P. Masson, Izaira T. Brandão, Ana C. M. Polizello, Fabiana R. de Moraes, Rodrigo Silva and Lenaldo B. Rocha for technical assistance. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, nos. 2008/01898-2 and 2002/12856-2) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) supported this study.

References

- Austyn, J.M., Gordon, S., 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* 11 (10), 805–815.
- Bazile, D.V., Ropert, C., Huve, P., Verrechia, T., Marland, M., Frydman, A., Veillard, M., Spenlehauer, G., 1992. Body distribution of fully biodegradable 14C-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. *Biomaterials* 13, 1093–1102.
- Cano, M.V., Hajjeh, R.A., 2001. The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Semin. Respir. Infect.* 16, 109–118.
- Champion, J.A., Walker, A., Mitragotri, S., 2008. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm. Res.* 25 (8), 1815–1821.
- Deepe Jr., G.S., Durose, G.G., 1995. Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 63, 3151–3157.
- Deepe Jr., G.S., Gibbons, R., 2001. Protective efficacy of H antigen from *Histoplasma capsulatum* in a murine model of pulmonary histoplasmosis. *Infect. Immun.* 69, 3128–3134.
- Deepe Jr., G.S., Gibbons, R.S., 2006. T cells require tumor necrosis factor- α to provide protective immunity in mice infected with *Histoplasma capsulatum*. *J. Infect. Dis.* 193 (2), 322–330.
- Eldridge, J.H., Staas, J.K., Meulbroek, J.A., Tice, T.R., Gilley, R.M., 1991. Biodegradable and biocompatible poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect. Immun.* 59, 2978–2986.
- Faisal, S.M., Weiwei, Y., McDonough, S.P., Chang, Y., 2009. *Leptospira* immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. *Vaccine* 27, 378–387.
- Feng, L., Qi, X.R., Zhou, X.J., Maitani, Y., Wang, S.C., Jiang, Y., Nagai, T., 2006. Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres. *J. Control. Release* 112, 35–42.
- Fischer, S., Schlosser, E., Mueller, M., Csaba, N., Merkle, H.P., Groettrup, M., Gander, B., 2009. Concomitant delivery of a CTL-restricted peptide antigen and CpG ODN by PLGA microparticles induces cellular immune response. *J. Drug Target.* 17 (8), 652–661.
- Gomez, A.M., Rhodes, J.C., Deepe Jr., G.S., 1991. Antigenicity and immunogenicity of an extract from the cell wall and cell membrane of *Histoplasma capsulatum* yeast cells. *Infect. Immun.* 59, 330–336.
- Gomez, F.J., Gomez, A.M., Deepe Jr., G.S., 1992. An 80-kDa antigen from *Histoplasma capsulatum* that has homology to heat shock protein 70 induces cell mediated immune responses and protection in mice. *Infect. Immun.* 60, 2565–2571.
- Gómez, B.L., Figueroa, J.L., Hamilton, J., Diez, S., Rojas, M., Tobón, A., Restrepo, A., Hay, R.J., 1999. Detection of the 70-kiloDalton *Histoplasma capsulatum* antigen in serum of histoplasmosis patients: correlation between antigenemia and therapy during follow-up. *J. Clin. Microbiol.* 37, 675–680.
- Green, L.C., Ruiz De Luzuriaga, K., Wagner, D.A., Rand, W., Istfand, N., Young, V.R., Tannenbaum, S.R., 1981. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 7764–7768.
- Gupta, R.K., Chang, A.-C., Griffin, P., Rivera, R., Guo, Y.-Y., Siber, G.R., 1997. Determination of protein loading in biodegradable polymer microspheres containing tetanus toxoid. *Vaccine* 15 (6/7), 672–678.

- Johansen, P., Gander, B., Merkle, H.P., Sesardic, D., 2000. Ambiguities in the preclinical quality assessment of microparticulate vaccines. *TIBTECH* 18, 203–211.
- Lima, K.M., Rodrigues Jr., J.M., 1999. Poly-DL-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 171–180.
- Lima, K.M., Santos, S.A., Lima, V.M., Coelho-Castello, A.A., Rodrigues Jr., J.M., Silva, C.L., 2003. Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial HSP-65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene Ther.* 10, 678–685.
- Malyala, P., O'Hagan, D.T., Singh, M., 2009. Enhancing the therapeutic efficacy of CpG oligonucleotides using biodegradable microparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 218–225.
- Medeiros, A.I., Sá-Nunes, A., Soares, E.G., Peres, C.M., Silva, C.L., Faccioli, L.H., 2004. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect. Immun.* 72 (3), 1637–1644.
- Medeiros, A.I., Sá-Nunes, A., Turato, W.M., Secatto, A., Frantz, F.G., Sorgi, C.A., Serezani, C.H., Deepe Jr., G.S., Faccioli, L.H., 2008. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. *J. Immunol.* 181, 8544–8551.
- Men, Y., Thomasin, C., Merkle, H.P., Gander, B., Corradin, G., 1995. A single administration of tetanus toxoid in biodegradable microspheres elicits T cell and antibody responses similar or superior to those obtained with aluminum hydroxide. *Vaccine* 13 (7), 683–689.
- Nicolette, R., Lima, K.M., Rodrigues Jr., J.M., Baruffi, M.D., Medeiros, A.I., Bentley, M.V.L.B., Silva, C.L., Faccioli, L.H., 2007. *In vitro* e *in vivo* activities of leukotrienes B4-loaded biodegradable microspheres. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 83, 121–129.
- Nicolette, R., Rius, C., Piqueras, L., Jose, P.J., Sorgi, C.A., Soares, E.G., Sanz, M.J., Faccioli, L.H., 2008. Leukotriene B4-loaded microspheres: a new therapeutic strategy to modulate cell activation. *BMC Immunol.* 9, 1–11.
- Sá-Nunes, A., Medeiros, A.I., Nicolette, R., Frantz, F.G., Panuntocastelo, A., Silva, C.L., Faccioli, L.H., 2005. Efficacy of cell-free antigens in evaluating cell immunity and inducing protection in a murine model of histoplasmosis. *Microbes Infect.* 7, 584–592.
- Schlosser, E., Mueller, M., Fischer, S., Basta, S., Busch, D.H., Gander, B., Groettrup, M., 2008. TLR ligands and antigen need to be coencapsulated into the same biodegradable microsphere for the generation of potent cytotoxic T lymphocyte responses. *Vaccine* 26, 1626–1637.
- Sinha, V.R., Trehan, A., 2003. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J. Control. Release* 90, 261–280.
- Trombone, A.P.F., Silva, C.L., Almeida, L.P., Rosada, R.S., Lima, K.M., Oliver, C., Jamur, M.C., Coelho-Castelo, A.A.M., 2007. Tissue distribution of DNA-Hsp65/TDM-loaded PLGA microspheres and uptake by phagocytic cells. *Genet. Vac. Ther.* 5 (9), 1–8.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 825–852.
- Wheat, L.J., 2006. Histoplasmosis: a review for clinicians from non-endemic areas. *Mycoses* 49, 274–282.
- Woods, J.P., 2002. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis and responsiveness to its environment. *Fungal Genet. Biol.* 35, 81–97.
- Wüthrich, M., Filutowicz, H.I., Warner, T., Deepe Jr., G.S., Klein, B.S., 2003. Vaccine immunity to pathogenic fungi overcomes the requirement for CD4 help in exogenous antigen presentation to CD8+ T cells: implications for vaccine development in immune-deficient hosts. *J. Exp. Med.* 197, 1405–1416.

Immunomodulatory effect of biodegradable microspheres containing leukotriene B₄ and cell-free antigens from *Histoplasma capsulatum* on murine bone marrow-derived macrophages

Daiane F. dos Santos; Roberto Nicolete; Claudia da S. Bitencourt; Patrícia R. M. de Souza; Priscilla A. T. Pereira; Carlos A. Sorgi; Célio L. Silva & Lúcia H. Faccioli

FIGURES/TABLES

PLGA MS	Size (μm)	Zeta potential (mV)	Encapsulation rate (%)
unloaded MS	6.390 ± 4.719	-29.9 ± 7.26	_____
LTB ₄ and CFAGs-loaded MS	9.057 ± 5.703	-24.4 ± 6.24	43.875 (LTB ₄); 54.14 (CFAGs)

Table 1. Size, zeta potential and encapsulation rate of PLGA MS.

Figure 1. *In vitro* cumulative release of LTB₄ (●) and CFAGs (○) from PLGA MS in ethanol/PBS (50:50), pH 7.4.

Figure 2. (A) Unloaded MS and (B) LTB₄ and CFAGs-loaded MS morphologies assessed by scanning electronic microscopy (SEM).

PLGA MS	% of BMDM ϕ containing MS	Phagocytic index
unloaded MS	31.83 $\pm$ 4.04	23.84 $\pm$ 5.17
LTB ₄ and CFAGs-loaded MS	71.91 $\pm$ 4.22 ***	208.37 $\pm$ 35.87 **

Table 2. Uptake of PLGA MS by BMDM ϕ after 4 h of incubation. Data are expressed in percentage of BMDM ϕ that engulfed at least one MS. The phagocytic index also calculated: PI = number of engulfed MS x number of BMDM ϕ containing at least one MS/total number of BMDM ϕ . Results are presented as mean $\pm$ S.E.M. (n= 6 – 11); ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$, values compared to unloaded MS (unpaired t -teste).

Figure 3. Confocal images of BMDMφ containing fluorescent unloaded MS (A) and LTB₄ and CFAGs-loaded MS (B).

Figure 4. (A) IL-1 α , (B) IL-6, (C) TNF- α , (D) IL-10 e (E) IL-12p40/p70 production by BMDM ϕ (1.0 x 10⁶ cells) after incubation of 24 h without stimulus, with 1 mg/ml of unloaded MS, CFAGs-loaded MS or LTB₄ and CFAGs-loaded MS, and LTB₄ or CFAGs in solution form (3.0 x 10⁻⁸ M and 50 μ g/ml, respectively). LPS (0.5 μ g/ml) was used as positive control. Cytokines concentrations in the supernatants of BMDM ϕ culture were quantified by ELISA. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n = 8); * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001, values compared with medium; ## P < 0.01 and ### P < 0.001, values compared with unloaded MS; and & P < 0.05 and && P < 0.001, CFAGs-loaded MS in comparison with CFAGs in solution form (unpaired t -test). ND = value not determined by assay).

Figure 5. (A) KC, (B) MCP-1/CCL2 and (C) RANTES/CCL5 production by BMDM ϕ (1.0×10^6 cells) after incubation of 24 h without stimulus, with 1 mg/ml of unloaded MS, CFAGs-loaded MS or LTB₄ and CFAGs-loaded MS, and LTB₄ or CFAGs in solution form (3.0×10^{-8} M and 50 μ g/ml, respectively). LPS (0.5 μ g/ml) was used as positive control. Chemokines concentrations in the supernatants of BMDM ϕ culture were quantified by ELISA. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n = 9); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, values compared with medium; ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$, values compared with unloaded MS; and & $P < 0.05$ and &&& $P < 0.001$, CFAGs-loaded MS in comparison with CFAGs in solution form (unpaired t -teste).

Figure 6. Nitrite (NO₂⁻) production by BMDMφ (1.0 x 10⁶ cells) after incubation of 24 h without stimulus, with 1 mg/ml of unloaded MS, CFAGs-loaded MS or LTB₄ and CFAGs-loaded MS, and LTB₄ or CFAGs in solution form (3.0 x 10⁻⁸ M and 50 μg/ml, respectively). LPS (0.5 μg/ml) was used as positive control. Nitrite concentrations in the supernatants of BMDMφ culture were quantified by Griess reaction. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n = 6); ** *P* < 0.01 and *** *P* < 0.001, values compared with medium; # *P* < 0.05 and ## *P* < 0.01, values compared with unloaded MS; and &&& *P* < 0.001, CFAGs-loaded MS in comparison with CFAGs in solution form (unpaired *t*-test).

Figure 7. Expression of CD86 costimulatory molecule on the surface of BMDM ϕ incubated with unloaded MS, CFAGs-loaded MS, LTB₄ and CFAGs-loaded MS, LTB₄ or CFAGs in solution form. Medium and LPS+IFN- γ were used as negative and positive controls, respectively. After 24 h, the expression of surface molecules was evaluated by flow cytometry. Each column represents the mean percentage of cells positive for CD86 $\pm$ S.E.M.; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, values compared to medium (unpaired t -teste).

Figure 8. Confocal images of BMDM ϕ incubated with medium (A), LPS 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (B), unloaded (C), CFAGs-loaded MS (D), LTB $_4$ and CFAGs-loaded MS (E), LTB $_4$ (3×10^{-8} M) (F) and CFAGs (50 $\mu\text{g/mL}$) (G). The images of the right, center and left show the staining for the cellular nucleus (DAPI, blue), NF- κ B (red) and colocalization of the images (pink), respectively. The arrows indicate the presence or not of NF- κ B in the cellular nucleus.