

ADRIANA MAGALHÃES SANTOS

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

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

SÃO PAULO
2010

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Dendritic cells. P10 peptide.

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS*

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

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

- BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 767-811, 2000.
- BANCHEREAU, J.; SCHULER-THURNER, B.; PALUCKA, A. K.; SCHULER, G. Dendritic cells as vectors for therapy. **Cell**, v. 106, p. 271-274, 2001.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, p. 209-221, 2008.
- BENARD, G.; DUARTE, A. J. S. Paracoccidioidomycosis: A Model for Evaluation of the Effects of Human Immunodeficiency Virus Infection on the Natural History of Endemic Tropical Diseases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 31, p. 1032-1039, 2000.
- BRAGA, C. J. M.; RITTNER, G. M. G.; HENAO, J. E. M.; TEIXEIRA, A. F.; MASSIS, L. M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; TABORDA, C. P.; TRAVASSOS, L. R.; FERREIRA, L. C. S. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FliC flagellin. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 4, p. 1700-1707, 2009.
- BOZZA, S.; MONTAGNOLI, C.; GAZIANO, R.; ROSSI, G.; NKWANYUO, G.; BELLOCCHIO, S.; ROMANI, L. Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. **Vaccine**, v. 22, p. 857-864, 2004.
- BRYANT, P.; PLOEGH, H. Class II MHC peptide loading by the professionals. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 16, p. 96-102, 2004.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: An update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 89-117, 1993.
- BUA, J.; BONTEMPI, E.; LEVIN, M.; ORN, A.; VELASCO, D.; MORENO, M.; LEVI-YEYATI, P.; ENGSTROM, A.; SEGURA, E.; RUIZ, A. *Trypanosoma cruzi*: cellular and antibody response against the parasite in mice immunized with a 19-amino acid synthetic peptide. **Exp. Parasitol.**, v. 72, p. 54-62, 1991.
- BUISSA-FILHO, R.; PUCCIA, R.; MARQUES, A. F.; PINTO, F. A.; MUÑOZ, J. E.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 7, p. 3321-3328, 2008.
- CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Path.**, v. 66, p. 585-594, 1985.
- CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides Brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 5, p. 615-623, 1998.

CALICH, V. L. G.; VAZ, C.A.C; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **73 rd Forum in Immunology**, p. 407-417, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- LIPSCOMB, M. F.; WILDER, J. A.; MASTEN, B. J. Dendritic cells and their role in linking innate and adaptive immune response. In: GESSANI, S.; BELARDELLI, F. (Eds.). **The biology of dendritic cells and HIV infection**. New York: Springer, 2007. p. 44-84.
- LIN, J. S.; YANG, C. W.; WANG, D. W.; WU-HSIEH, B. A. Dendritic cells cross-present exogenous fungal antigens to stimulate a protective CD8 T cell response in infection by *Histoplasma capsulatum*. **J. Immunol.**, v. 174, p. 6282-6291, 2005.
- LIN, C. L.; SURI, R. M.; RAHDON, R. A.; AUSTYN, J. M.; ROAKE, J. A. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 4114-4122, 1998.
- LIU, K.; NUSSENZWEIG, M. C. Origin and development of dendritic cells. **Immunol. Rev.**, v. 234, p. 45-54, 2010.
- LU, W.; ARRAES, L. C.; FERREIRA E SILVA, W. T.; ANDRIEU, J. M. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. **Nat. Med.**, v. 10, p. 1359-1365, 2004.
- LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localisada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hypoblastomycoses americanas. **Braz. Med.**, v. 22, n. 15, p.141-144, 1908.
- LUTZ, M. B.; KUKUTCH, N.; OGILVIE, A. L. J.; RÖBNER, S.; KOCH, F.; ROMANI, N.; SCHULER, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **J. Immunol. Methods**, v. 223, p. 77-92, 1999.
- MACDONALD, K. P.; MUNSTER, D. J.; CLARK, G. J.; DZIOONEK, A.; SCHMITZ, J.; HART, D. N. Characterization of human blood dendritic cell subsets. **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4512-4520, 2002.
- MANETTI, R.; PARRONCHI, P.; GIUDIZI, M. G.; PICCINNI, M.; MAGGI, E.; TRINCHIERI, G.; ROMAGNANI, S. Natural killer cell stimulatory factor (Interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 1199-1204, 1993.
- MANZ, M. G.; TRAVER, D.; MIYAMOTO, T.; WEISSMAN, I. L.; AKASHI, K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. **Blood**, v. 97, n. 11, p. 3333-3341, 2001.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: Atualização Epidemiológica, Clínica e Terapêutica. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 2, p.135-150, 2003.
- MARQUES, A. F.; SILVA, M. B.; JULIANO, M. A. P.; MUNHÖZ, J. E.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v. 10, p. 1251-1258, 2008.

- MARTINEZ, R. Paracoccidiodomicose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 204-221.
- MATTOS GROSSO, D.; ALMEIDA, S. R.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6534-6542, 2003.
- MCEWEN, J. G.; GARCIA, A. M.; ORTIZ, B. L.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.**, v. 26, p. 305-306, 1995.
- MENEZES, V. M.; SOARES, B. G.; FONTES, C. J. F. Drugs for treating paracoccidiodomycosis. **Cochrane Database Syst. Rev.**, n. 2, p.1-16, 2009.
- MONTENEGRO, M. R.; MIYAJI, M.; FRANCO, M.; NISHIMURA, K.; COELHO, K. I.; HORIE, Y.; MENDES, R. P.; SANO, A.; FUKUSHIMA, K.; FECCHIO, D. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, state of Sao Paulo, Brazil, an endemic area of paracoccidiodomycosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 665-670, 1996.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.
- MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, v. 17, n. 3, p. 138-146, 1996.
- MOSER, M.; MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. **Nature Immunol.**, v. 1, p. 199-205, 2000.
- NAVA-PARADA, P.; FORNI, G.; KNUTSON, K. L.; PEASE, L. R.; CELIS, E. Peptide vaccine given with a Toll-like receptor agonist is effective for the treatment and prevention of spontaneous breast tumors. **Cancer Res.**, v. 67, p. 1326-1334, 2007.
- NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. **Prensa Med. Argent.**, v. 53, n. 39, p. 2381-2382, 1966.
- NI, K.; O'NEILL, H. C. The role of dendritic cells in T cell activation. **Immunol. Cell Biol.**, v. 75, p. 223-230, 1997.
- OKADA, N., TSUJINO, M.; HAGIWARA, Y.; TADA, A.; TAMURA, Y.; MORI, K.; SAITO, T.; NAKAGAWA, S.; MAYUMI, T.; FUJITA, T.; YAMAMOTO, A. Administration route-dependent vaccine efficiency of murine dendritic cells pulsed with antigens. **Br. J. Cancer**, v. 84, p. 1564-1570, 2001.

- OUAISSI, A.; GUILVARD, E.; DELNESTE, Y.; CARON, G.; MAGISTRELLI, G.; HERBAULT, N.; THIEBLEMONT, N.; JEANNIN, P. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-Like receptor 2, and confers protection against lethal infection. **J. Immunol.**, v. 168, p. 6366-6374, 2002.
- PANDEY, M.; BATZLOFF, M. R.; GOOD, M. F. Mechanism of protection induced by group A Streptococcus vaccine candidate J8-DT: contribution of B and T-cells towards protection. **PLoS One**, v. 4, p. e5147, 2009.
- PERRY, J. A.; RUSH, A.; WILSON, R. J.; OLVER, C. S.; AVERY, C. Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC. **J. Immunol.**, v. 172, p. 475-482, 2004.
- PERRUCCIO, K.; BOZZA, S.; MONTAGNOLI, C.; BELLOCCHIO, S.; AVERSA, F.; MARTELLI, M.; BISTONI, F.; VELARDI, A.; ROMANI, L. Prospects for dendritic cell vaccination against fungal infections in hematopoietic transplantation. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 33, p. 248-255, 2004.
- PIERRE, P.; TURLEY, S. J.; GATTI, E.; HULL, M.; MELTZER, J.; MIRZA, A.; INABA, K.; STEINMAN, R. M.; MELLMAN, I. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. **Nature**, v. 388, p. 787-792, 1997.
- PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009.
- PLOTKIN, S. A. Vaccines, vaccination and vaccinology. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 1349-1359, 2003.
- PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. A. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*. Identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, v. 53, p. 199-206, 1986.
- PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. 43-Kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 1610-1615, 1991.
- PULENDRAN, B.; SMITH, J. L.; CASPARY, G.; BRASEL, K.; PETTIT, D.; MARASKOVSKY, E.; MALISZEWSKI, C. R. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 1036-1041, 1999.
- RAMOS-E-SILVA, M.; SARAIVA, L. E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol. Clin.**, v. 26, n. 2, p. 257-269, 2008.
- RANDOLPH, G. J.; OCHANDO, J.; PARTIDA-SANCHEZ, S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 293-316, 2008.
- REID, C. D.; STACKPOOLE, A.; MEAGER, A.; TIKERPAE, J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony stimulating factor and other cytokines in

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- SOONG, L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. **J. Immunol.**, v. 180, p. 4355-4360, 2008.
- SPLENDORE, A. Zymonematosi con localizzazione nella cavità della boca, osservata in Brasile. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 5, p. 313-319, 1912.
- STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs in mice. I. Morphology, quantification, tissue distribution. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 1142-1162, 1973.
- STEINMAN, R. M.; WITMER, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, n. 10, p. 5132-5136, 1978.
- STEINMAN, R. M.; POPE, M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. **J. Clin. Investig.**, v. 109, p. 1519-1526, 2002
- STEVENS, D. A. Vaccinate against aspergillosis! A call to arms of the immune system. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, p. 1131-1136, 2004.
- TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 554-556, 1994.
- TABORDA, C. P.; JULIANO, M. A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L. R. Mapping of the T-cell epitope in the major 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 786-793, 1998.
- THURNER, B.; HAENDLE, I.; RÖDER, C.; DIECKMANN, D.; KEIKAVOUSSI, P.; JONULEIT, H.; BENDER, A.; MACZEK, C.; SCHREINER, D.; VON DEN DRIESCH, P.; BRÖCKER, E. B.; STEINMAN, R. M.; ENK, A.; KÄMPGEN, E.; SCHULER, G. Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. **J. Exp. Med.**, v. 190, p. 1669-1678, 1999.
- TRAVASSOS, L. R.; RODRIGUES, E. G.; IWAI, L. K.; TABORDA, C. P. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. **Mycopathologia**, v. 165, p. 341-352, 2008.
- TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P.; COLOMBO, A. L. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 6, n. 2, p. 251-262, 2008
- TROMBETTA, E. S.; MELLMAN, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 975-1028, 2005.
- TURLEY, S J.; INABA, K.; GARRETT, W. S.; EBERSOLD, M.; UNTERNAEHRER, J.; STEINMAN, R. M.; MELLMAN, I. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. **Science**, v. 288, p. 522-527, 2000.

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

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

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

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