ORIANA MAYORGA NADER

Análise de diferentes adjuvantes associados ao peptídeo P10 usados no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*

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

São Paulo
2012

ORIANA MAYORGA NADER

Análise de diferentes adjuvantes associados ao peptídeo P10 usados no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *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

Versão original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Mayorga-Nader, Oriana.
Análise de diferentes adjuvantes associados ao peptídeo P10 usados no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* / Oriana Mayorga-Nader. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Estudo da Imunidade humoral e celular nas infecções causadas por fungos sistêmicos.

Versão do título para o inglês: Analysis of different adjuvants associated to P10 peptide for treatment of BALB/c infected mice with *Paracoccidioides brasiliensis*.

1. Paracoccidiodomicose 2. *Paracoccidioides brasiliensis* 3. Adjuvantes 4. Dioctadecyl-dimethylammonium-bromide 5. FliC flagelina 6. P10 I. Taborda, Prof. Dr. Carlos Pelleschi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0201/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Oriana Mayorga-Nader.

Título da Dissertação: Análise de diferentes adjuvantes associados ao peptídeo P10 usados no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*.

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda.

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

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

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **147** nas fls. **78** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Carlos Pelleschi Taborda , Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Análise de diferentes adjuvantes associados ao peptídeo P10, usados no tratamento de camundongos BALB/c infectados com Paracoccidioides brasiliensis** do qual participou(aram) o(s) alunos **Oriana Mayorga, Julián Esteban Muñoz e o pesquisador Nilton Lincopan,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **20.10.09,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 21 de outubro de 2009.

Prof. Dr. Ariel M. Silber
Dpto. de Parasitologia
ICB - USP
silber@usp.br

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

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

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional,

Aos meus irmãos, pela força e o carinho imenso,

Aos meus amigos pela música e os bons desejos ....

Obrigada!!!!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Carlos Peleschi Taborda por ter me dado a oportunidade de de fazer o mestrado no seu laboratório, por ter me proporcionado um grande crescimento profissional, por suas orientaçoes e conchecimentos, muito obrigada mesmo!.

Ao professor Gabriel Padilla, por ter me dado seu apoio desde o começo aqui no Brasil.

Ao Professor Dr. Luiz R. Travassos, agradeço por todas as sugestões e participações neste trabalho.

Aos Professores Gabriel Padilla, Nilton Lincopan, Luis Carlos de Souza Ferreira, Marilis do Valle Marques, Sandro Rogério de Almeida, Welington Luiz de Araújo e por terem me recebido com gentileza em seus laboratórios e pelo apoio em vários aspectos deste trabalho.

Ao meu amigo e colega Julian Esteban Muñoz por ter me orientado, por compartilhar tudos seus conhecimentos e experiencias, pela confiança e apoio, pelas sugestões e pela disposição para me ensinar, muito obrigada!!!

A todos os colegas e amigos do laboratório, Martha Urán, Márcia Pinto da Silva, Leandro Buffoni, Lucas Dias e Glauce M. G. Rittner, Adriana Menezes, Fernanda Dias, Renata **Amelia**, Diego Rossi, Thor A. Sessa, Luciana Thomaz, Felipe Augusto, Adriana Magalhães, Juliana de Amorim, Paula Barbarian, Vinicius D. Luft, e Shirlei A. Vieira Marques.

As minhas grandes amigas Adriana e Diana, por estar sempre me acompanhando e apoiando, pela força e por acreditar em mim, pelo milhão de historias que a gente tem para lembrar....

Aos amigos e colegas da pós-graduação, Julian e Juan Diego, Aline, Carolina, Victor, Dani, Anderson e Inarei pela boa disposição e o convívio durante esses anos.

Ao técnico do biotério Carlos Augusto da Silva pelo cuidado dos animais durante o período de estagio e mestrado.

Aos funcionários da Sala de Esterilização José e Elza pela colaboração.

Aos secretários da Pós-Graduação e do Departamento de Microbiología, Elizabete Ribeiro, Bruno e Celso Pereira, Alice Shimabuku, Ana Maria Amaral e Naíde Farripas pela amabilidade e boa disposição no atendimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq pelo apoio financeiro.

O melhor cientista é aberto à experiência
e começa com o romance.....
a idéia de que tudo é possível.
Ray Bradbury.

RESUMO

MAYORGA, O**. Análise de diferentes adjuvantes associados ao peptídeo P10 usados no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*.** 2012. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose crônica, prevalente na America Latina, é uma doença sistêmica granulomatosa causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis.* Conídios produzidos na fase de filamentosa podem iniciar a infecção. Historicamente, a proteção contra paracoccidioidomicose tem sido atribuída á vigorosa resposta imunológica, enquanto que anticorpos específicos tem sido associados com a severidade da doença. A gp43 é o principal antígeno diagnóstico que contém o peptídeo de 15 aminoácidos (QTLIAIHTLAIRYAN) designado como P10, que desenvolve a resposta imune do tipo Th1 dependente de IFN-γ, sendo o principal candidato para a efetiva imunoterapia de pacientes com PCM, considerado como adjuvante da quimioterapia convencional. No presente trabalho, comparamos a efetividade de diferentes adjuvantes em camundongos BALB/c infectados intratraquealmente com o isolado virulento Pb18 ($3x10^5$). Alúmen, Adjuvante Completo e Incompleto de Freund (CFA/IFA), FliC flagelina proveniente de *Salmonella enterica* e o lipídeo catiônico (dioctadecyl-dimethylammonium bromide), foram testados em associação ou não com P10. Após 52 dias de infecção, foi observada uma redução significativa do número de unidades formadoras de colônia (UFCs) nos pulmões de camundongos imunizados com P10, associado com os diferentes adjuvantes. O lipídeo catiônico mostrou os melhores resultados, com o menor número de UFCs, redução de fibrose determinada pela coloração de Masson's trichrome e baixo número de células fúngicas no tecido pulmonar, determinado pela coloração de Hematoxilina/Eosina (HE), além do incremento significativo de IFN-γ e TNF-α e a redução dos niveis de IL-4 e IL-10. A geração de células de memória foi significativa para os grupos imunizados com o peptídeo nas diferentes formulações com os adjuvantes, enquanto que na geração de células Th17, o lipídeo catiônico e a flagelina incrementaram o efeito indutor do P10 na proliferação de linfócitos T $CD4^+$ $ROR\gamma t^+$. Estes resultados sugerem que a interação do peptídeo P10 com o lipídeo catiônico pode gerar uma melhor resposta imune mediada por células do tipo Th1, evitando a rápida disseminação da paracoccidioidomicose experimental.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidioidomicosis. P10. Adjuvantes. Dioctadecyl-dimethylammonium-bromide. FliC flagelina. Alumen. Adjuvante completo de Freund.

ABSTRACT

MAYORGA, O**. Analysis of different adjuvants associated to P10 peptide for treatment of BALB/c infected mice with *Paracoccidioides brasiliensis***. 2012. 84 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Paracoccidioidomycosis (PCM), a chronic mycosis, prevalent in Latin America, is a systemic granulomatous disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Conidia produced in the filamentous phase can initiate an infection. Historically, protection against paracoccidioidomycosis has been attributed to vigorous immune response, while specific antibodies have been associated with disease severity. The gp43 is the major diagnostic antigen that contains the peptide P10. This peptide has 15 amino acids (QTLIAIHTLAIRYAN) and develops a Th1-dependent IFN-γ immune response, being the main candidate for effective immunotherapy to PCM considered an adjunct to conventional chemotherapy. In this work, we compare the effectiveness of different adjuvants in BALB/c mice infected intratracheally with virulent isolate Pb18 ($3x10^5$). Alum, Complete Adjuvant and Incomplete Freund's adjuvant (CFA/IFA), fliC flagellin from *Salmonella enterica* and cationic lipid (dioctadecyl-dimethylammonium bromide) were tested in combination or not with P10. After 52 days of infection was observed a significant reduction in the number of colony forming units (CFU) in lungs of mice immunized with P10, associated with different adjuvants. The cationic lipid showed the best results with the least number of CFUs, reduction of fibrosis, determined by staining Masson's Trichrome, low number of fungal cells in lung tissue, determined by staining of hematoxylin / eosin (HE), and the significant increase of IFN-γ and TNF-α and reducing levels of IL-4 and IL-10.The generation of memory cells was significant for the groups immunized with the peptide in different adjuvants formulations, whereas the generation of Th17 cells, the lipid cationic and flagellin increased the inducing effect of P10 on proliferation of CD4 + RORγt +. These results suggest that, the interaction of peptide P10 with cationic lipids can lead to a better immune response mediated by Th1 type cells by avoiding the rapid spread of experimental paracoccidioidomycosis.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidioidomycosis. P10. Adjuvants. Dioctadecyl-dimethylammonium-bromide. FliC flagellin. Alum. Complete Freund’s adjuvant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Esquema do protocolo de imunização.....38

Figura 2- Unidades Formadoras de Colônias de pulmão de camundongos BALB/c infectados i.t. com 3 x 10^5 células de *P. brasiliensis* e tratados nos dias 30, 37 e 44 após infecção com os diferentes adjuvantes, associados ou não com P10.....44

Figura 3- Detecção de citocinas no tecido pulmonar de camundongos BALB/c após 52 dias de infecção.....45

Figura 4- Histopatología de pulmões de camundongos BALB/c infectados i.t., imunizados 30 dias após infecção com P10 associado ao lipídeo catiônico, FliC Flagelina e Alumen.....47

Figura 5- Histopatología de pulmões de camundongos BALB/c infectados i.t., imunizados 30 dias após infecção com P10 associado ao lipídeo catiônico, FliC Flagelina e Alumen.....48

Figura 6- Caracterização de células T com fenótipo de memoria $CD4^+$ $CD44^{hi}$.....49

Figura 7- Caracterização de células T $CD4^+$ $ROR\gamma t^+$ no baço.....51

Figura 8- Distribuição de tamanho (Dz) e Potencial zeta (ζ) do lipídeo catiônico e o peptídeo P10 em dispersão.....53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Celulas apresentadoras de antigeno
$AlPO_4$	Fosfato de aluminio
$Al(OH)_3$	Hidroxido de aluminio
BHI	Brain heart infusion – Infusão de cérebro e coração
CCR7	C-C chemokine receptor 7 - Receptor de quimiocina C-C 7
CFA	Complete Freund´s adjuvant – adjuvante completo de freund
DTH	Delayed type hypersensitivity – Hipersensibilidade do tipo tardio.
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DODAB	Dioctadecyl-dimethylammonium bromide
Dz	Media do diámetro
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay – Ensaio imunossorbente ligado à enzima
FITC	Fluorescein isothiocyanate - Isotiocianato de fluoresceína
FliCd	Flagelina tipo d
FljB	Flagelina tipo b
FMO	Fluorescence minus one – Fluorescência menos um
gp43	Glicoproteína de 43 kDa
HLA-DR	Receptor de MHC de clase II
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio.
H2SO4	Ácido sulfúrico
Hsp	Heat Shock Protein - Proteína de choque térmico
I.D	Teste de imunodifusão
IFA	Incomplete Freund´s adjuvant – adjuvante incompleto de freund
IFN-γ	Interferon gama
I.N.	Intranasal
I.T.	Intratraqueal
I.P.	Intraperitoneal
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12

IL-17	Interleucina-17
IL-17A	Interleucina-17A
IL-17RA	Receptor de interleucina A
IL-22	Interleucina-22
IL-23	Interleucina-23
$KAl(SO_4)_2$	Alumen
kDA	Quilodalton
LAL	Lisado de amebocitos de Limulus
LB	Luria bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Major Histocompatibility Complex - Complexo principal de histocompatibilidade
MPLA	Monofosforil lipideo A
MR	Receptor de manose
mW	Miliwatts
NO	Óxido nítrico
NNLS	Non negatively constrained least squares algorithm.
Tregs	Células T reguladoras
P10	Peptídeo P10
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns – Padrões moleculares associados á patógenos.
PBS	Phosphate Buffer Saline – Salina fosfatada tamponada
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell – células mononucleares do sangue periférico.
PCM	Paracoccidioidomicose
PCS	Dinamic light scattering – dinâmica de dispersão de luz
PE	R-Phycoeritrin - Ficoeritrina
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex – Complexo protéico peridina clorofila
PFA	Paraformaldeido
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoeletrico
pg	Picograma
PLG	Polylactide-co-glycolide – Poli lático -co- glicolico

PLGA	Poli(ácido lático-co-acido glicolico)
PMN	Celulas polimorfonucleares
RORγt	Retinoic acid Receptor-related Orphan Receptor gamma t Receptor órfão relacionado ao receptor de ácido retinóico gama t
SDS-PAGE	Duodecil Sulfato de sodio eletroforese em gel de poliacrilamida.
SFB	Soro fetal bovino
SPF	Specific Pathogen Free - Condição livre de patógenos
TCR	Receptor de células T
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfocito T helper 2
Th17	Linfócitos T helper 17
TLR	Toll Like Receptors - Receptores semelhantes ao Toll
TMB	Tetramethyl Benzidine - Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFC	Unidades formadoras de colônia
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
ζ	Potencial zeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 A Paracocciodioidomicose 17
1.2 *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da paracoccidioidomicose 20
1.3 Tratamento da PCM 22
1.4 Gp 43 principal antígeno de *P. brasiliesis* 23
1.5 P10 e sua função imunoprotetora 24
1.6 Adjuvantes 26
1.6.1 CFA/IFA 27
1.6.2 Sais de alumínio 28
1.6.3 Flagelina 30
1.6.4 Lipídeos Catiônicos 31
2 JUTIFICATIVA 33
3 OJETIVOS 34
4 MATERIAL E MÉTODOS 35
4.1 Animais 35
4.2 Fungo 35
4.3 Infecção Intratraqueal (i.t.) 35
4.4 Grupos utilizados 36
4.5 Síntese e Purificação do Peptídeo (P10) 36
4.6 Imunização dos camundongos com o peptídeo (P10) 36
4.7 Preparo e obtenção dos adjuvantes 36
4.7.1 Alumen 36
4.7.2 Adjuvante completo e incompleto de Freund 36
4.7.3 Flagelina FliCd 37
4.7.4 Lipídeo catiônico: (DODAB) 38
***4.8* Imunização com os adjuvantes** 38
4.9 Análise de material biológico 39
4.9.1 Determinação da carga fúngica 39
4.9.2 Análise histológica 39
4.9.3 Caracterização das Citocinas: ELISA para a Quantificação de IL-4, IL-10, IL17, IL-23, TNF- α e IFN-γ 39
4.9.4 Obtenção de esplenócitos para imunofenotipagem 40

4.9.5 Imunofenotipagem por citometría de fluxo 41
4.10 Determinação do diâmetro médio, distribuição de tamanho, polidispersões e potencial Zeta para os complexos P10/ Adjuvante 41
4.11 Análise estatística 42
5 RESULTADOS 43
5.1 Unidades formadoras de colônias dos camundongos BALB/c infectados e imunizados ou não, com peptídeo 10 (P10) 43
5.2 Quantificação das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL- 10 no homogeneizado de pulmão dos camundongos BALB/c infectados e imunizados com o P10 44
5.3 Histologia do pulmão de camundongos BALB/c infectados intratraquealmente com Pb18 e imunizados, ou não, com P10 45
5.4 Caracterização de células T com fenótipo de memória no baço. Animais imunizados com o peptídeo P10 associado aos diferentes adjuvantes 49
5.5 Caracterização de células T $CD4^+$/RORγt^+ no baço. Animais imunizados com o peptídeo P10 associado aos diferentes adjuvantes 51
5.6 Análise de tamanho e potencial zeta dos adjuvantes associados com o peptídeo P10 53
6 DISCUSSÃO 54
7 CONCLUSÕES 65
REFERÊNCIAS* 66
APÊNDICE - Artigo publicado 78

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Paracocciodioidomicose

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica, causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, foi descrita pela primeira vez em 1908 por Adolfo Lutz (LUTZ, 1908). Endemicamente limita-se à América latina, sendo Brasil, Venezuela e Colômbia os países com maior número de casos reportados, especialmente em áreas rurais, cuja população dedicada-se às atividades agrícolas e é a principal afetada (BLOTTA et al., 1999; BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; RESTREPO et al., 2008).

No Brasil, as zonas com maior número de casos reportados compreendem as regiões sul, sudeste e centro-oeste do pais. A PCM não é uma doença de notificação compulsória, razão pela qual não existem dados precisos sobre sua incidência e prevalência no Brasil. Porém, com base na experiência de serviços de referência no atendimento de pacientes com PCM, acredita-se que a incidência anual em zonas endêmicas varia de 3-4 novos casos/1.000.000 habitantes até 1-3 novos casos/100.000 habitantes (RESTREPO et al., 2008; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Entretanto, a partir do ano 2008 foi estabelecida uma nova lei no estado de São Paulo referente às recomendações para as atividades de vigilância e controle da Paracoccidioidomicose (SÃO PAULO, 2008).

A doença representa um grande problema de saúde pública, pois possui alto potencial incapacitante e ocorre uma quantidade considerável de mortes prematuras. Além disso, atinge indivíduos na sua fase mais produtiva da vida, causando um forte impacto social e econômico (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A PCM é a décima causa mais comum das mortes por infecções crônicas/recorrentes e doenças parasitarias no Brasil, aproximadamente 51,2% do total de mortes causadas por micoses sistêmicas foram causadas pela PCM no período de 1996 - 2006 (PRADO et al., 2009).

Pacientes adultos do sexo masculino apresentam a maior incidência da doença, principalmente aqueles que se dedicaram ao trabalho rural. Entretanto, estudos demonstraram a emergência de focos de infecção em zonas periurbanas (BLOTTA et al., 1999). Também tem sido descrita como uma infecção oportunista

em pacientes HIV positivo, pacientes com neoplasias, e raramente pacientes com transplante de órgãos (AMEEN et al., 2009; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

O período de latência no homem pode ser de meses a vários anos, dificultando assim, a determinação precisa do local onde foi adquirida a infecção (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993). A infecção acontece quando propágulos “conídios” produzidos na fase filamentosa do fungo são inalados, e esses migram até alcançar o parênquima pulmonar. Acredita-se que, em áreas endêmicas, a infecção pulmonar primária ocorre provavelmente nas duas primeiras décadas de vida do individuo (ALMEIDA; JACKS; SCULLY, 2003).

Quando a doença se desenvolve, pode permanecer contida nos pulmões ou disseminar-se para outros órgãos ou sistemas através da via hematogênica e/ou linfática, causando lesões secundárias (FRANCO et al., 1987). O desenvolvimento da doença está sujeito a diversos fatores como a quantidade de conídios inalados, a patogenicidade do fungo, grau de virulência e ao status imunológico do paciente, assim como fatores genéticos (WANKE; AIDÊ, 2009). Adicionalmente, o tabagismo e o consumo de álcool são fatores de risco fortemente associados com o desenvolvimento da doença (RESTREPO et al., 2008; SANTOS et al., 2003).

Atualmente, a PCM pode ser classificada em quatro diferentes categorias de acordo com o estado clinico do individuo: aqueles indivíduos portadores do fungo e que são assintomáticos; pacientes com a forma aguda ou subaguda da doença (tipo juvenil); pacientes com a forma crônica (tipo adulto) que pode ser unifocal ou multifocal e aqueles pacientes que foram tratados e apresentam sequelas da doença. (ALMEIDA; JACKS; SCULLY, 2003; BENARD; DUARTE, 2000; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A forma aguda ou subaguda abrange entre 3% a 5% do total de casos de PCM, é comum em crianças, jovens e adultos de ambos os sexos, principalmente com idades entre 20 e 30 anos (WANKE; AIDÊ, 2009). Pacientes com a forma aguda ou subaguda apresentam altos níveis de anticorpos específicos. com envolvimento do sistema fagocítico mononuclear e o sistema imune celular comprometido. A resposta imune desenvolvida leva à formação de granulomas frouxos, associados com o alto número de células fúngicas viáveis (ALMEIDA; JACKS; SCULLY, 2003; FRANCO et al., 1987). A doença na forma aguda tem uma progressão rápida, e desenvolve sintomas como linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas.

Esses sintomas são também observados em pacientes com HIV (RESTREPO et al., 2008; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; WANKE; AIDÊ, 2009).

Pacientes com a forma crônica da doença são geralmente homens com idade entre 30 e 60 anos, e encontram-se numa proporção maior com relação aos casos crônicos em mulheres (15:1 respectivamente). A maioria dos casos de paracoccidioidomicose progridem para a forma crônica, com instalação lenta e gradual pela reativação de focos quiescentes. O curso da doença pode demorar meses ou anos até se desenvolver completamente, localizando-se em órgãos e tecidos de modo mais focal. A forma crônica manifesta-se com lesões de tipo granulomatoso envolvendo principalmente os pulmões e posteriormente disseminando-se para outros órgãos, como mucosas, baço, fígado, pele e em alguns casos o trato digestivo. Em alguns casos a doença está restrita somente a um orgão (unifocal), enquanto que na maioria dos casos, a doença envolve mais de um (multifocal) sendo pulmões, mucosas e pele, os sítios mais acometidos pela infecção (ALMEIDA; JACKS; SCULLY, 2003; RESTREPO et al., 2008; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; WANKE; AIDÊ, 2009). Geralmente, os pacientes apresentam baixos níveis de anticorpos específicos e ativação da resposta imune celular, levando à formação de granulomas compactos com menor número de leveduras nas lesões (MENDES; RAPHAEL, 1971; MONTENEGRO; FRANCO, 1994).

O envolvimento pulmonar e a fibrose residual são observadas em aproximadamente 80% e 60% dos pacientes com PCM, respetivamente. No parênquima pulmonar, *P. brasiliensis* induz dano crônico levando ao desenvolvimento de fibrose, provavelmente devido ao estimulo antigênico persistente e a subsequente resposta imune. No final do processo granulomatoso, é possível observar o aumento de tecido conectivo e estimulação da produção de colágeno do tipo I e III, o que origina o estabelecimento da fibrose e a subsequente alteração funcional dos pulmões, cujo efeito incapacitante reduz a qualidade de vida do paciente, levando ao óbito num significativo número de casos (NARANJO et al., 2010; TOBON et al., 2003)

Com relação ao diagnóstico da PCM, o exame de microscopia direta é o mais adequado já que permite a rápida identificação do fungo. O exame é feito a partir de materiais clínicos como escarro ou biópsia de tecido. Testes sorológicos como imunoblot, ELISA podem ser realizados para detecção anticorpos fúngicos quando não for possível a identificação do fungo por microscopia. Contudo, o teste de

imunodifusão dupla (ID) em gel ágar é o mais utilizado no diagnóstico da PCM devido à sensibilidade e especificidade superior em comparação com outros métodos. É recomendado para este tipo de testes que os soros sejam titulados para uma melhor interpretação da resposta terapêutica considerando que, os títulos de anticorpos diminuem progressivamente com o controle clinico da doença (AMEEN et al., 2009; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; WANKE; AIDE, 2009).

1.2 *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da paracoccidioidomicose

Paracoccidioides brasiliensis, agente etiológico da PCM, é um fungo filamentoso quando encontra-se em temperaturas de 18 a 25 ºC, enquanto que em temperaturas de 35 a 37 ºC cresce em forma de levedura. Essa mudança na morfologia é considerada fundamental para o estabelecimento da infecção (CAMARGO; FRANCO, 2000; FRANCO, 1987).

Na forma de bolor, as colônias apresentam um crescimento lento, e estão constituídas por micélios aéreos finos, septados e com ramificações, apresentam clamidoconidios laterais e intercalares. Algumas vezes é possível notar a presença de estruturas reprodutoras “conídios” (RESTREPO-MORENO, 2003). Acredita-se que a infecção por *P. brasiliensis* acontece principalmente pela inalação desses conídios, os quais com o aumento da temperatura recebem um estímulo e se transformam em leveduras nos alvéolos pulmonares, tal como foi comprovado experimentalmente em camundongos (McEWEN et al., 1987). Morfologicamente, as leveduras são caracterizadas pela geração de múltiplos brotamentos (blastoconídios) a partir de uma célula mãe, o que permite a identificação do fungo em tecidos de pacientes infectados (LACAZ et al., 2002; RESTREPO-MORENO, 2003).

Além do dimorfismo, existem outros fatores que facilitam a patogenicidade do fungo, como a síntese de α-(1,3)-glucana que contribui na proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (revisto por HOGAN; KLEIN; LEVITZ, 1996). Da mesma forma, a melanina presente nas leveduras e conídios participa na evasão da resposta imune, principalmente da atividade fagocítica dos macrófagos (TABORDA et al., 2008). A presença de moléculas de adesão e produção de enzimas líticas (proteinases, lipases e fosfolipases) são importantes para nutrição do fungo e a invasão dos tecidos. O antígeno imunodominante de *P. brasiliensis,* a

glicoproteína gp43 também possui ação proteolítica e facilita adesão do fungo às células epiteliais, por ser um ligante da laminina (VICENTINI et al., 1994), atua inibindo a produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) entre outras funções dos macrófagos (ALMEIDA; UNTERKIRCHER; CAMARGO, 1998), facilitando a invasão do fungo nos tecidos do hospedeiro, particularmente na fase inicial da infecção (KONNO et al., 2009).

O estudo da ecologia de *P. brasiliensis* está baseado na análise de pacientes com a forma juvenil da doença, especificamente com crianças. Considerando que o perfil migratório dessa população é restrito, é possível obter dados relacionados com o habitat do fungo a partir das zonas de residência desse tipo de pacientes (RESTREPO; McEWEN; CASTAÑEDA, 2001). Foram realizados estudos utilizando o teste da paracoccidioidina em adultos com ou sem a micose, no seu local de nascimento. O mesmo teste também foi realizado em crianças com a micose, com residência em seu local de nascimento. Fazendo a comparação entre populações, foi possível determinar que as taxas de exposição estão correlacionadas significativamente com variáveis como altitude (1000-1499 m), precipitações (2000-2999 mm), temperatura (17 e 24 ºC) e zonas com abundantes fontes hídricas, onde predominam atividades agrícolas e de deflorestação. (BAGALI et al., 2008; CADAVID; RESTREPO, 1993; RESTREPO; McEWEN; CASTAÑEDA, 2001)

Aspectos relacionados com o habitat do fungo ainda não estão bem definidos, acredita-se que o solo é o habitat natural de *P. brasiliensis*. Existe a hipótese de que o fungo cresce preferencialmente perto da superfície do solo, aproximadamente 2-20 cm da superfície (BARROZO et al., 2009). O fungo foi isolado a partir de amostras de solo em diferentes locais no Brasil (MONTENEGRO et al., 1996; SHOME; BATISTA, 1963; SILVA VERGARA et al., 1998), na Argentina (NEGRONI, 1966) e Venezuela (ALBORNOZ, 1971). Adicionalmente, *P. brasiliensis* foi isolado a partir de diferentes fontes como fezes de pinguins *Pygoscelis adeliae* (GEZUELE, 1989) e morcegos *Artibeus lituratu* (GROSE; TAMSITT, 1965), ração de cachorro provavelmente contaminada com solo (FERREIRA et al., 1990).

Existe uma alta incidência de infecção de *P. brasiliensis* em tatus *Dasypus novemcinctus,* uma espécie que mora imerso no solo, típica da América do Sul (CORREDOR et al., 1999). O fungo foi isolado de órgãos como o pulmão, baço, fígado e linfonodos. Além disso, analise histopatológica de tecido mostrou a formação de granulomas contendo células fúngicas do patógeno, indicando que

além transportar o fungo, o tatu pode desenvolver a doença (BAGAGLI et al., 1998; SILVA-VERGARA et al., 2000). Entretanto, esses resultados são ainda preliminares, sendo necessária a sua reprodutibilidade e a utilização de novas técnicas para determinar o nicho ecológico de *P.brasiliensis* (Revisto por BAGAGLI et al., 2008; RESTREPO; McEWEN; CASTAÑEDA, 2001).

1.3 Tratamento da PCM

No tratamento da PCM podem ser utilizados vários antifúngicos, dependendo do estado do paciente, tais como anfotericina B, sulfamídicos (sulfadiazina, associação sulfametoxazol/trimetoprim), e azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol). O itraconazol é o antifúngico de preferência no tratamento das formas com severidade leve e moderada em menor período de tempo, apresenta toxicidade baixa, produz 90% de cura e uma taxa de recidiva de 0-15% dependendo das co-morbidades como a desnutrição e síndrome de imunodeficiência adquirida (AMEEN et al., 2009). Entretanto, “considerando que o medicamento não está disponível na rede pública da maioria dos Estados, a combinação sulfametoxazol-trimetroprim é a alternativa mais utilizada na terapêutica ambulatorial dos pacientes com PCM” (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). É importante considerar que apesar de ser um medicamento de baixo custo, os períodos de tratamento são longos e pode ter um efeito toxico levando a supressão da medula óssea com trombocitopenia e leucopenia (MENEZES; SOARES; FONTES, 2009).

Em casos de pacientes com formas graves é requerida administração intravenosa de anfotericina B ou de sulfametoxazol/trimetoprim, já quando há melhora clinica, podem ser administradas por via oral. Usualmente o tratamento é de longa duração para permitir o controle das manifestações clínicas da micose e evitar as recidivas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Embora 60% das pessoas tratadas com anfotericina B sejam curadas, a utilização do medicamento é limitado pela frequência de efeitos adversos e as taxas de recidivas (20-30%). A anfotericina pode levar a morte por arritmia cardíaca e falência renal. Entretanto, novas formulações de anfotericina B com moléculas lipídicas apresentam menor toxicidade, mas com custos elevados (LORTHOLARY; DENNING; DUPONT, 1999; MENEZES; SOARES; FONTES, 2009).

Apesar da eficácia das drogas de uso clínico, os casos de recidivas da

doença ainda são significativamente frequentes. A vacinação terapêutica com antígenos fúngicos ou a transferência passiva de anticorpos monoclonais pode induzir a resposta imune celular aditiva ao efeito protetor da quimioterapia permitindo, eventualmente, controlar as recidivas e a redução fibrose sequelar (TRAVASSOS; TABORDA, 2012). Porém, o desenvolvimento de vacinas preventivas ou terapêuticas contra PCM são de grande importância e têm sido exaustivamente estudadas mediante a seleção de componentes imunogênicos que possam levar à proteção do hospedeiro.

1.4 Gp 43 principal antígeno de *P. brasiliesis*

A função imunoprotetora do principal antígeno diagnóstico de *P. brasiliensis*, a glicoproteína de 43 kDa (gp43) é expressa de forma constitutiva nas fases de bolor e levedura do fungo (GOLDANI et al., 1994); contém uma única cadeia de oligossacarídeos (ALMEIDA et al., 1996) e foi caracterizada bioquimicamente por Puccia et al. (1986) a partir dos componentes extracelulares secretados durante a cultura das leveduras de *P. brasiliensis* em meio liquido. Esses componentes foram selecionados por imunoprecipitação utilizando a técnica de imunodifusão. Posteriormente foram purificados em coluna de Sepharose e classificados de acordo com seu peso molecular por gel de SDS-PAGE.

Anticorpos contra esta glicoproteína são encontrados no soro de aproximadamente 100% dos pacientes com PCM (CAMARGO et al., 1988), sendo utilizada também no monitoramento de indivíduos que recebem tratamento (revisado por MARQUES et al., 2004). A gp43 contém epítopos que tem a capacidade de produzir uma resposta imune celular (DTH) em cobaias (RODRIGUES; TRAVASSOS, 1994; TABORDA; CAMARGO, 1993) e em humanos (SARAIVA et al., 1996). Além de ser imunodominante para produção de anticorpos, essa glicoproteína tem a capacidade de estimular linfócitos T $CD4^+$ Th1 produtores de IFN-γ e IL-2 (TABORDA et al., 1998), assim como também pode estimular a imunidade inata mediante interação com monócitos, modulando a expressão dos receptores de padrões de reconhecimento TLR2, TLR4, MR e a produção de citocinas Pró e anti-inflamatórias (NAKAIRA-TAKAHAGI et al., 2011).

Considerando a atividade imunogênica da gp43, foram determinados os epítopos mediadores das respostas imunológicas, selecionando aqueles com

potencial para ensaios de vacinação. Foram analisados 25 peptídeos sintetizados quimicamente que abrangem a sequência inteira de aminoácidos da gp43. Diferentes peptídeos que contém o domínio HTLAIR induziram a proliferação de linfócitos de camundongos sensibilizados com a gp43 purificada ou infectados intratraquelmente com *P. brasiliensis*. Entre esses peptídeos, um trecho específico de 15 aminoácidos, denominado como P10 com a sequencia QTLIAIHTLAIRYAN, foi responsável pela ativação das células T e da proteção contra PCM em camundongos BALB/c. A linfoproliferação induzida por P10 ou pela gp43 envolve a produção de IL-2 e IFN-γ pelos linfócitos T CD4 (TABORDA et al., 1998).

1.5 P10 e sua função imunoprotetora

O efeito protetor do peptídeo é devido principalmente à resposta imune celular mediada por IFN-γ e, diferente da gp43, o P10 não induz a resposta humoral. As imunizações com P10 em camundongos BALB/c os levam a uma infecção pulmonar 200 vezes menos intensa que os animais não imunizados. A ação protetora do P10 é claramente observada na histopatología dos pulmões, onde a estrutura alveolar encontra-se preservada, contendo uma população menor de macrófagos, sem lesões granulomatosas e ausência de células fúngicas (TABORDA et al., 1998; TRAVASSOS; TABORDA, 2012).

Um fator importante na utilização de peptídeos sintéticos como vacinas em diferentes populações é o fato que os epítopos precisam ser reconhecidos por células T de indivíduos que apresentam moléculas distintas de MHC. Em camundongos, o P10 é apresentado pelas moléculas do MHC de classe II de três haplotipos diferentes (TABORDA et al., 1998). A traves do programa TEPITOPE, utilizado para seleção de sequencias peptídicas com maior probabilidade de ligação a múltiplas moléculas de HLA-DR em caucasianos, foi demonstrado que o P10 é um peptídeo promiscuo, sendo um importante candidato vacinal para ser utilizado em humanos (IWAI et al., 2003).

Com o objetivo de melhorar o tratamento da PCM e de prevenir as recidivas da doença, foram realizadas imunizações com o peptídeo associado a drogas antifúngicas em modelo murino. O tratamento realizado com drogas como itraconazol e sulfametoxazol/trimetoprim entre outras, conjunto ao P10, mostrou um efeito protetor quando administrado às 48 horas ou 30 dias após o desafio

intratraqueal, reduzindo significativamente a carga fúngica nos pulmões e preservando a estrutura alveolar, além de prevenir a disseminação do fungo para baço e fígado (MARQUES et al., 2006). Esses resultados foram também observados em camundongos anérgicos submetidos à quimioterapia e imunizados com o peptídeo, apresentando uma resposta Th1 protetora com incremento significativo nos níveis de IFN-γ e IL-12. Isto sugere que a vacinação com P10 pode ser utilizada para melhorar a quimioterapia convencional e reduzir o tempo de tratamento, inclusive nos casos de pacientes anérgicos (MARQUES et al., 2008).

Partindo desses achados, novas metodologias tem sido utilizadas com o peptídeo P10, com o objetivo de desenvolver uma vacina terapêutica contra a paracoccidioidomicose.

Com a ideia de desenvolver uma vacina especifica de DNA, baseada predominantemente na resposta imune mediada por células, foram utilizados plasmídeos com o inserto do gene de P10 e da interleucina 12 (IL-12) nas imunizações profiláticas e terapêuticas de camundongos BALB/c e B10.A, desafiados i.t. com o isolado virulento Pb18. A vacinação com o plasmídeo que expressa o P10 levou à redução da carga fúngica nos pulmões de animais infectados. A vacinação realizada com o plasmídeo com inserto para P10 associados ao que expressa IL-12 foi mais efetiva na eliminação do fungo, com recuperação das estruturas pulmonares e produção significativa de IL-12 e IFN-γ (RITTNER et al., 2012). Adicionalmente, a imunização com o plasmídeo que codifica o P10 induz a proliferação de células de memoria assim como células T reguladoras, ajudando na redução do dano tecidual decorrente da resposta imune protetora (AMORIM, 2010). Dessa forma, os plasmídeos são uma importante alternativa para a prevenção e o tratamento da PCM experimental.

As células dendríticas pulsadas com P10 apresentam um alto potencial na vacinação devido á capacidade de rápida proteção contra o desenvolvimento da PCM, assim como no tratamento da doença estabelecida. Ensaios realizados com esplenócitos de camundongo, estimulados com células dendríticas pulsadas com P10, demonstraram um incremento significativo na proliferação, quando comparado com esplenócitos estimulados unicamente com o peptídeo. Em camundongos, a administração de células dendríticas pulsadas com o peptídeo antes (via subcutânea) e depois (via subcutânea e intravenosa) da infecção intratraqueal com *P. brasiliensis,* levou à redução da carga fúngica nos pulmões, preservando os

tecidos. Os níveis de IFN-γ e IL-12 foram incrementados ao tempo que houve uma redução na produção de IL-10 e IL-4, em comparação com os grupos de animais não imunizados (controle) e àqueles que não foram tratados com as células pulsadas (MAGALHÃES et al., 2012).

A resposta imune induzida pelo P10 evita a disseminação rápida de *P. brasiliensis*, porém acredita-se na hipótese de que a administração do P10 com novos adjuvantes pode incrementar a função imunoprotetora do peptídeo.

1.6 Adjuvantes

Os adjuvantes são moléculas, compostos ou complexos de macromoléculas que aumentam o potencial e a longevidade da resposta imune especifica contra um antígeno, tendo uma baixa toxicidade e um efeito imunológico de longa duração (WACK; RAPPUOLI, 2005). A adição de adjuvantes às vacinas permite o incremento, manutenção e direcionamento da imunogenicidade dos antígenos, modulando de maneira apropriada a resposta imune e reduzindo a quantidade de antígeno, assim como o número de imunizações requeridas (KENNEY; EDELMAN, 2003; REED et al., 2009; STILLS, 2005).

As vacinas tradicionais, baseadas em microrganismos atenuados, geralmente não requerem adição de adjuvantes porque dispõem de imunogenicidade alta. Embora as vacinas baseadas em proteínas ofereçam vantagens consideráveis em relação às vacinas tradicionais, em termos de segurança e custo de produção, na maioria dos casos apresentam uma atividade imunogênica limitada e requerem da adição de adjuvantes para induzir uma resposta imune protetora prolongada (REED et al., 2009).

A classificação dos adjuvantes varia de acordo com a composição, propriedades físico-químicas ou com o mecanismo de ação (MARCIANI, 2003; REED et al., 2009). Adjuvantes que agem diretamente no sistema imune para incrementar a resposta aos antígenos são chamados imunoestimulantes tais como ligantes a TLRs (Toll-like receptors), citocinas, saponinas e endotoxinas bacterianas. Outros adjuvantes agem como veículos otimizando a apresentação dos antígenos ao sistema imune, através da liberação controlada e de sistemas depositantes que facilitam o aumento da resposta imune especifica. Alguns exemplos desse tipo de adjuvantes são as sais minerais, emulsões, lipossomas, nanopartículas obtidas de

proteínas virais e microesferas de polímeros biodegradáveis (O'HAGAN; MACKICHAN; SINGH, 2001; REED et al., 2009).

Contudo, os adjuvantes podem ser classificados de acordo com a capacidade estimuladora da imunidade de tipo Th1 (celular) ou Th2 (humoral). Os adjuvantes podem atuar como estimuladores tanto da imunidade inata como adaptativa e podem ser classificados de acordo com o tipo de receptor de ligação (MARCIANI, 2003).

A associação do P10 com adjuvantes como CFA (MARQUES et al., 2008; TABORDA et al., 1998); alumen, MPLA (MARQUES, 2007); flagelina (BRAGA et al., 2009) e nanopartículas de PLGA (AMARAL et al., 2010) mostraram uma redução significativa da carga fúngica em pulmões de camundongos infectados i.t. com *P.brasiliensis*, sendo promissores para o tratamento da PCM experimental.

1.6.1 CFA/IFA

O adjuvante completo de Freund (CFA) é uma emulsão (água em óleo) composta de óleo mineral ou de parafina, surfactante (Mannide Monooleate), e células inativadas de *Mycobacterium* (*Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum*) como imunoestimulante (STILLS, 2005). Desde sua descrição em 1937 por Freund et al. o CFA tem sido o adjuvante mais utilizado e efetivo para a produção experimental de anticorpos e apresenta três mecanismos de ação específicos: (I) Armazenamento do antígeno com a liberação lenta do mesmo; (II) veículo de transporte do antígeno através do sistema linfático em direção às células efetoras do sistema imune; (III) interação com as células apresentadoras de antígeno incluindo fagócitos, macrófagos e células dendríticas (CHANG et al., 1998; ZHOU; AFSHAR, 1995).

A primeira razão para o uso de um adjuvante na imunização experimental em animais é para produzir uma maior atividade e afinidade dos anticorpos e de igual forma, um maior título, assim o CFA é recomendado, considerando que os componentes de M*ycobacterium* tendem a produzir uma forte hipersensibilidade do tipo tardia e controlar a resposta direcionada a um perfil Th1 (LINBLAD, 2000). A presença de TLRs, especialmente de TLR-2 e TLR-4, é crítica para o reconhecimento e para resposta imune ante as infecções micobacterianas por meio dos macrófagos e células dendríticas. As espécies de micobactérias variam na

composição da parede celular, já que produzem diferentes lipomananas e lipoarabinomananas que atuam com diferentes TLRs podendo produzir efeitos pro-inflamatórios e anti-inflamatórios. (revisto por STILLS, 2005).

As imunizações realizadas com CFA associado ao peptídeo P10, tem demonstrado um efeito protetor reduzindo significativamente a carga fúngica nos pulmões de camundongos BALB/c infectados, prevenindo a disseminação do fungo para outros orgãos como baço e fígado, mesmo após três meses de infecção (TABORDA et al., 1998). Esses resultados tem sido reproduzidos em vários experimentos no nosso laboratório, observando o efeito aditivo do P10 ao tratamento com drogas antifúngicas com camundongos normais (MARQUES et al., 2006) e no estado anérgico induzido com dexametazona (MARQUES et al., 2008).

Embora o CFA seja amplamente utilizado, este adjuvante tem sido associado com uma variedade de lesões, como dermatite necrosante, formação de granulomas em órgãos como fígado, rins e no local de injeção. O uso de CFA tem sido limitado e com muitas restrições às imunizações experimentais em estudos com animais. Devido a severidade das reações adversas, tem sido proibido para uso medicinal humano e veterinário (CUTLER; DEEPE; KLEIN, 2007; STILLS, 2005).

Diferente do CFA, o adjuvante incompleto de Freund (IFA) não contém células de *Mycobacterium*, atuando principalmente como veiculo dos antígenos, sem o efeito imunoestimulante. Este adjuvante é também utilizado experimentalmente na produção de anticorpos e tem sido testado amplamente em vacinas contra o vírus da influenza em humanos, demostrando níveis de proteção significativos, com um efeito menos agressivo no local de injeção. Portanto, o principal fator limitante do adjuvante é a deficiência no aumento da resposta imune celular, a qual pode ser critica para o controle de varias infecções (CHANG et al., 1998).

1.6.2 Sais de alumínio

O efeito adjuvante dos sais de alumínio foi descrito pela primeira vez em 1926, baseado na observação de que, alúmen precipitado com toxóide diftérico induziu uma melhor resposta imune em cobaias, quando comparado com o antígeno simples (KWAK; LONGO, 1996). Os adjuvantes de alumínio, na forma de hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$), fosfato de alumínio ($AlPO_4$) ou alumen ($KAl(SO_4)_2.12H2O$)

são frequentemente utilizados em diferentes formulações vacinais devido ao excelente histórico de segurança (BAYLOR; EGAN; RICHMAN, 2002).

A preparação das vacinas com adjuvantes de alumínio pode ser realizada de duas formas: adição do antígeno à uma solução de alumen ou em géis pré-formados de hidróxido ou fosfato de alumínio. O primeiro produz a precipitação da proteína ligada ao alumen e o segundo resulta na adsorção do antígeno pelas sais de alumínio (BAYLOR; EGAN; RICHMAN, 2002; GUPTA, 1998).

A efetividade desses adjuvantes depende da forma em que o antígeno liga-se ao alumínio, o qual ocorre quando o antígeno incorpora-se dentro ou sobre as partículas de gel, pela co-precipitação com o alumínio ou também quando o antígeno é ligado ás partículas por interações iônicas. No caso dos antígenos proteicos, é possível obter uma maior adesão entre a proteína e as partículas de alumínio quando a cargas dessas moléculas são opostas. Da mesma forma, o ponto isoelétrico (pI) tanto da proteína como do alumínio são determinantes na estabilidade do antígeno no complexo e portanto, na efetividade da vacina (DONNELLY, 1997; SHIRODKAR et al., 1990).

Formulações vacinais baseadas em proteínas recombinantes para doenças como hepatite B e HPV tem sido desenvolvidas e induzem respostas de anticorpos altamente protetoras utilizando sais de alumínio como adjuvante. Outras vacinas recombinantes para doenças como malária, tuberculose, HIV e/ou AIDS requerem a indução de uma resposta de anticorpos forte e prolongada, além de uma potente imunidade mediada por células TCD4 e TCD8. O alumen é deficiente na indução de respostas do tipo Th1 (pro-inflamatório) sendo necessário o desenvolvimento de novos adjuvantes e de novas formulações

Embora esse adjuvante seja amplamente utilizado em vacinas humanas (hepatite B e HPV entre outras) e veterinárias (REED et al., 2009), sendo altamente efetivo no estimulo das respostas imunes primarias contra antígenos alvo, com relação as respostas secundárias, o adjuvante induz um perfil de resposta anti-inflamatória (Th2), que estimula principalmente a produção de anticorpos. O alumen é insuficiente na indução de resposta imune celular do tipo Th1 (pro-inflamatória), sendo menos adequado para vacinas contra microrganismos intracelulares (CUTLER; DEEPE; KLEIN, 2007; HOGENESCH, 2002).

Diferentes opiniões tem sido manifestadas com relação aos adjuvantes de alumínio. Em geral, as vacinas que contém este tipo de adjuvantes tem demonstrado

um perfil de segurança por mais de seis décadas, embora tenham sido associados a graves reações locais, tais como eritema, nódulos subcutâneos e hipersensibilidade de contato (BAYLOR et al., 2002).

1.6.3 Flagelina

A maior consideração no desenvolvimento de vacinas é incrementar a imunogenicidade de um antígeno, isso pode ser feito através da coadministração dos antígenos com adjuvantes que sejam seguros e efetivos. Diferentes compostos microbianos desenvolvem uma efetiva função como adjuvantes pela interação com as células apresentadoras de antígenos (APCs) tais como macrófagos, células dendríticas e monócitos (CUADROS et al., 2004).

Os compostos de parede das bactérias, tais como LPS e ácidos lipoteicoicos, são exemplos de moléculas imunoestimuladoras, conhecidas como PAMPs que interagem com as APCs através dos receptores da família TLR (Toll-Like Receptors). O reconhecimento desses produtos microbianos pelos TLRs leva a ativação de uma variedade de vias de transdução de sinal e a subsequente indução de citocinas e moléculas coestimuladoras, além da modulação do MHC I/II nas APCs. Porém, os TLRs podem ter um papel crítico na ligação entre a imunidade inata e adaptativa (LIEN; GOLENBOCK, 2003; PINO; MARTIN; MICHALEK, 2005).

Outras estruturas, como os flagelos bacterianos são um importante fator de virulência, cuja função facilita a colonização e invasão dos tecidos, induzindo o recrutamento das células inflamatórias do hospedeiro. Cada flagelo esta composto por filamentos, os quais estão formados por 11 protofilamentos que contem flagelina quase na totalidade da sua estrutura (SMITH et al., 2003).

A flagelina é a proteína monomérica composta de aproximadamente 500 aminoácidos formando a maior porção dos flagelos bacterianos. Esta proteína possui domínios bem conservados (D0 e D1) entre espécies bacterianas distantes, correspondente às cadeias N- e C- terminais que rodeiam a região central hipervariável dos monômeros de flagelina (MURTHY et al., 2004).

Tem sido demonstrado que os domínios conservados da flagelina são importantes indutores da resposta inflamatória (SMITH et al., 2003) e em consequência, estudos realizados com animais deficientes na expressão de TLR5 mostraram que a flagelina (FliC e FljB) de *Salmonella enterica* sorovar Typhimorium

tem a capacidade de ativar o sistema imune inato através da interação com TLR5, desenvolvendo um efeito imunoprotetor contra a infecção causada por Salmonella (MURTHY et al., 2004; PINO; MARTIN; MICHALEK, 2005; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004).

Estudos realizados para determinar o efeito adjuvante da flagelina (FljB) associada com antígenos, mostraram o aumento da resposta imune tanto nas mucosas como ao nível sistêmico mediante o incremento significativo dos graus de anticorpos, ao tempo que respostas mediadas por células TCD4 foram induzidas nos camundongos imunizados intranasalmente com o complexo antígeno-FljB (PINO; MARTIN; MICHALEK, 2005).

No modelo experimental da PCM, os camundongos que foram imunizados (i.n.) com P10 associado á flagelina (FliC) apresentaram uma redução do crescimento do fungo, com a diminuição do dano no tecido pulmonar, consequente com o incremento na produção de citocinas como IFN-γ e IL-12. Esses resultados indicam que a FliC flagelina participa na modulação da resposta imune de tipo Th1, potencializando o efeito protetor do peptídeo P10, sendo uma alternativa promissória na geração de vacinas para o tratamento da PCM (BRAGA et al., 2009).

1.6.4 Lipídeos Catiônicos

As partículas são amplamente utilizadas na área biomédica e farmacêutica devido á similaridade do tamanho com as moléculas biológicas (proteínas, DNA, etc.) e as estruturas dos diferentes microrganismos, sendo empregadas principalmente como sistemas de entrega de drogas e vacinas (LINCOPAN; ESPINDOLA; CARMONA-RIBEIRO, 2007).

O uso das partículas como sistemas de entrega para vacinas injetáveis, baseia-se na sua facilidade para serem captadas pelas células apresentadoras de antígeno, de modo que a entrega dos antígenos é mais eficiente quando comparado com o antígeno solúvel (VIDARD et al., 1996). As partículas asseguram que tanto o antígeno como o adjuvante sejam liberados ao mesmo grupo de APCs, limitando a distribuição sistémica do adjuvante e minimizando os possíveis efeitos adversos (O'HAGAN; SINGH, 2003).

Geralmente, as partículas lipídicas e poliméricas são as mais adequadas para liberação de antígenos e, acredita-se que o tamanho tem um papel importante na

atividade imunogénica, já que as partículas mais pequenas (<10 µm) são significativamente mais imunogênicas do que as de maior tamanho (O'HAGAN et al., 1991). Isto ocorre possivelmente devido a uma maior captação das partículas menores pelas APCs (O'HAGAN; SINGH; HULMER, 2004). Partículas entre 40-50 nm tem uma capacidade significativamente maior na indução de respostas Th1 quando comparadas com partículas maiores (>500 nm), as quais são mais adequadas na indução de respostas Th2 e de anticorpos (FIFIS et al., 2004).

Embora vários estudos tenham demonstrado o potencial dos antígenos encapsulados em micropartículas para a indução de respostas imunes efetivas, exista a possibilidade de ocorrer trocas ou danos na conformação dos antígenos durante a encapsulação, assim como na liberação a partir das micropartículas poliméricas, sendo uma limitante no desenvolvimento de micropartículas como adjuvantes vacinais. Em consequência, a aplicação de micropartículas de *polylactide-co-glycolide* (PLG) como adjuvantes tem sido fortemente estudada baseando-se em que os antígenos se aderem à superfície deste tipo de partículas, demostrando resultados promissórios (O'HAGAN; SINGH; ULMER, 2004).

Por outro lado, os fragmentos em bicamada de lipídeos catiônicos obtidos pela sonicação de vesículas de *dioctadecyl dimethylammonium bromide* (DODAB), tem sido usados como agentes antimicrobianos e na produção de complexos com partículas de sílica e látex para apresentação de antígenos ao sistema imune, demonstrando seu potencial como adjuvantes na indução da resposta imune celular (LINCOPAN; ESPINDOLA; CARMONA-RIBEIRO, 2007; LINCOPAN et al., 2009).

Lincopan et al. (2009) descrevem o potencial dos lipídeos catiônicos como adjuvantes, cujo uso baseia-se em que as micropartículas catiônicas são tomadas efetivamente, tanto pelas células dendríticas, como pelos macrófagos, já que a atração eletrostática promove a união entre partículas e sua posterior interiorização. As partículas poliméricas cationizadas transportam o antígeno, aumentando a produção de anticorpos e células T citotóxicas com uma dose baixa de antígeno (LINCOPAN et al., 2009; SINGH et al., 2000), induzindo também a maturação de células dendríticas (LITTLE et al., 2004; THIELE et al., 2001). A utilização de lipídeos catiônicos como adjuvantes pode induzir a produção de altos níveis de IL-12 e IFN-γ, sugerindo sua importante aplicação no desenho de vacinas contra diversos microrganismos e, neste caso, para o *P. brasiliensis*.2

2 JUTIFICATIVA

A maior parte dos trabalhos publicados pelo nosso grupo, utilizou CFA como ajuvante nos modelos experimentais de vacinação. Considerando as restrições atuais do uso de CFA em animais, assim como sua proibição em humanos, propomos neste estudo comparar a eficácia de vários adjuvantes, tradicionais e novos, com uma possível aplicação no futuro, inclusive em seres humanos.

3 OJETIVOS

- Verificar se a imunização com diferentes adjuvantes associados à administração do P10 reduz a carga fúngica em diferentes órgãos e/ou permite obter uma melhor resposta imune;

- verificar a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias nos pulmões dos animais infectados, imunizados com o peptídeo P10 associado a diferentes adjuvantes Th1/Th2;

- analisar a produção de citocinas IL-17 e IL-23 e o envolvimento de Th17 nos pulmões de camundongos imunizados e infectados;

- observar a modulação da resposta imune no tecido pulmonar, através da histopatología, frente aos diferentes adjuvantes associados ao P10;

- identificar a geração de células T de memória durante o processo de imunização dos camundongos;

- identificar a geração de células Th17 durante o processo de imunização dos camundongos;

- avaliar a interação físico-química dos diferentes adjuvantes e o peptídeo;

- determinar a carga superficial e o tamanho dos complexos em cada formulação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c, com média de idade entre 6 e 8 semanas. Os animais foram criados em condições de SPF (*Specific Pathogen Free*), no biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e mantidos no biotério de experimentação animal do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II. Os animais foram manipulados de acordo com as normas do comitê de ética do instituto.

4.2 Fungo

Foi utilizado o isolado virulento *Paracoccidioides brasiliensis* 18 (Pb18), mantido em meio semi-sólido Fava-Netto durante 7 dias a 37 ºC . O fungo foi lavado três vezes utilizando solução salina tamponada (PBS, pH 7,4). Após a decantação das partículas maiores, foi feita a contagem das leveduras em câmara de Neubauer. A viabilidade dos inóculos utilizados foi determinada por coloração com azul de Trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), considerando aqueles com viabilidade superior a 95%.

4.3 Infecção Intratraqueal (i.t.)

Após a lavagem, a concentração do fungo, para o inoculo, foi ajustada para $3x10^5$ células/50 μL^{-1}. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, com 300 µL de solução contendo 80 $mgkg^{-1}$ de ketamina (Divisão Vetbrands Saúde Animal, Sespo, SP) e 10 $mgkg^{-1}$ de xilazina (Rompun, Bayer, São Paulo, SP, Brasil). Quando os animais se apresentaram insensíveis à dor (após dez minutos), foi realizada uma incisão longitudinal na pele do pescoço, facilitando a exposição da traquéia para a inoculação do fungo. Foram usadas seringas de 1 mL (Becton Dickinson, Brasil) para a inoculação. Após a sutura, os animais foram mantidos aquecidos até acordarem da anestesia.

4.4 Grupos utilizados

Foram utilizados 11 grupos de camundongos BALB/c machos contendo 6 animais cada, sendo seis grupos controle: 1) grupo não infectado/não tratado; 2) infectado não tratado; 3) infectado e imunizado com CFA/IFA; 4) infectado e imunizado com Alumen; 5) infectado e imunizado com lipídeo catiônico; 6) infectado e imunizado com flagelina. Cinco grupos de animais infectados foram imunizados com o peptídeo P10 associado ou não com os respectivos adjuvantes: 7) infectado e imunizado com P10; 8) infectado e imunizado com CFA/IFA + P10; 9) infectado e imunizado com Alumen + P10; 10) infectado e imunizado com lipídeo catiônico + P10; 11) infectado e imunizado com flagelina + P10.

4.5 Síntese e Purificação do Peptídeo (P10)

O peptídeo P10 (QTLIAIHTLAIRYAN) foi sintetizado e purificado por PEPTIDE 2.0, Inc. (Chantilly, VA, USA).

4.6 Imunização dos camundongos com o peptídeo (P10)

Após 30 dias de infecção, os camundongos foram imunizados por via subcutânea com 20 µg do P10 associado ou não com os respectivos adjuvantes.

4.7 Preparo e obtenção dos adjuvantes

4.7.1 Alumen

O adjuvante foi cedido gentilmente pela Professora Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, do laboratório de bacteriologia no Instituto Butantan.

4.7.2 Adjuvante completo e incompleto de Freund

Os adjuvantes foram obtidos de (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), cuja concentração de trabalho foi de 1:1 de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 20 µL do adjuvante, 20 µL do peptídeo P10 e 10 µL de PBS para uma dose de 50 µL por animal. A mistura foi homogeneizada fortemente no vortéx

até formar uma emulsão branca. A primeira imunização foi realizada com CFA por via subcutânea e as duas seguintes foram feitas com IFA também pela via subcutânea.

4.7.3 Flagelina FliCd

A flagelina FliCd foi produzida no laboratório de desenvolvimento de vacinas do instituto de ciências biomédicas. A linhagem de *Salmonella dublim,* utilizada para a extração do flagelo, foi cultivada em meio LB com 100 µg de ampicilina e incubada a 37 ºC durante 16 h. As células foram centrifugadas e ressuspensas em 2 mL de PBS. A suspensão bacteriana foi agitada em "blender" para quebra dos flagelos fazendo 4 ciclos de 2 min com intervalos de 2 min no gelo. A suspensão foi centrifugada novamente para remoção das células, o sobrenadante foi coletado e adicionado 3 a 4 volumes de acetona para precipitar a flagelina presente. Após 30 min. de repouso a -20 ºC, o material foi centrifugado e o precipitado ressuspendido em aproximadamente 0,5 mL de PBS. As flagelinas purificadas passaram por um tratamento (65 ºC por 30 min) para dissociação dos monômeros (BRAGA et al., 2009; TEIXEIRA, 2011).

A remoção dos lipopolissacarídeos (LPS) contaminantes foi realizada utilizando triton x-114. Em 1 mL de proteína adicionou-se 100 µL de triton x-114 10% cuidadosamente homogeneizado com a pipeta. Em seguida, a amostra foi incubada por 30 min no gelo e homogeneizada em vórtex a cada 10 min. Após esse procedimento, a amostra foi incubada a 37 ºC durante 10 min e centrifugada por 5 min a 3000 g em temperatura ambiente. A fase aquosa foi coletada cuidadosamente para nâo haver contaminação com a fase oleosa. Esse procedimento foi realizado 10 vezes e após a quantificação da endotoxina pelo teste LAL (Lisado de amebócitos de Limulus), (Lonza Ltda., São Paulo, SP, Brasil), foi obtida a proteína dentro dos limites aceitáveis de LPS (3.0 unidades de endotoxina/g de proteína). A concentração da proteína foi determinada utilizando o kit BCA (Pierce, Rockford, IL, USA) e a pureza da proteína foi monitorada por SDS-PAGE (BRAGA et al., 2009; TEIXEIRA, 2011).

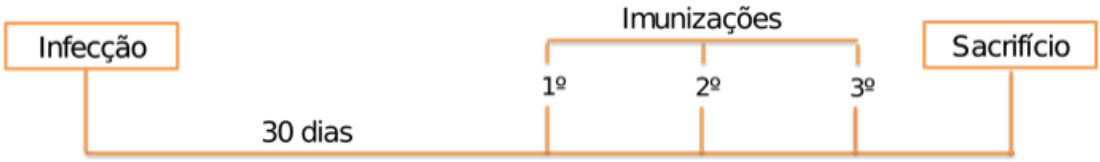
4.7.4 Lipídeo catiônico: (DODAB)

O lipídeo catiônico *dioctadecyl-dimethylammonium bromide* “DODAB” (Sigma-Aldrich) foi preparado para atingir uma concentração de 2.0 mM em solução salina NaCl 1 mM. Posteriormente, foi sonicado (80–90 mW, 20 min, 70 ºC) para assim adquirir fragmentos de camada dupla com diâmetro médio de 73 ± 1 nm e potencial zeta de 41± 3 mV. Uma vez sonicada, a solução foi centrifugada (10000 rpm) e o sobrenadante foi diluído em solução salina (NaCl 1 mM) para assim, atingir a concentração adequada para as imunizações (LINCOPAN et al., 2009).

4.8 Imunização com os adjuvantes

As imunizações foram iniciadas, 30 dias após infecção, num total de 3 doses, sendo uma por semana. Os adjuvantes utilizados foram o CFA (Sigma-Aldrich), emulsificado com a mesma quantidade de P10 (20 µL) na primeira dose; as subsequentes foram feitas com adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich). Alumen (100 µg/mL), Flagelina FliC (5 µg/animal) e lipídeo catiônico (DODAB) na concentração de 0.1 mM/animal. Todos foram levados ao vórtex juntamente com o peptídeo. Após 8 dias da última imunização, quando os animais completaram 52 dias de infecção, foram sacrificados. O protocolo de imunização encontra-se esquematizado na figura 1.

Figura 1 - Esquema do protocolo de imunização.



Camundongos BALB/c foram infectados i.t. ($3x10^5$ células/50 µL), 30 dias após infecção foram imunizados a cada sete dias para um total de 3 doses. Após 8 dias da ultima imunização, os animais foram sacrificados.

4.9 Análise de material biológico

Os camundongos foram sacrificados de acordo com as normas do comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas, de acordo com a carta de aprovação do projeto nº. 147/09. Após o sacrifício dos animais, foram retirados os órgãos (pulmão, baço e fígado) para realizar as análises correspondentes à determinação da carga fúngica, histologia de tecido pulmonar, caracterização de citocinas, proliferação e imunofenotipagem celular.

4.9.1 Determinação da carga fúngica

Após sacrifício dos animais, os órgãos (pulmão, baço e fígado) foram extirpados, e pesados imediatamente. Com o auxílio de um homogeneizador manual, as células foram rompidas em PBS, acertando-se volumes de 1mL para o baço e de 2 ml para pulmão e fígado. Desta solução, 100μL foram plaqueados em meio Brain Heart Infusion (BHI) (Becton Dickinson, USA), suplementado com 4% de soro fetal bovino (Gibco, NY, USA) e 5% de filtrado de cultura do isolado 192 de *P. brasiliensis* (CASTAÑEDA et al., 1988), 1% de estreptomicina e penicilina (Sigma-Aldrich). As placas foram mantidas a 37 °C por um período de 7 a 15 dias. O número de colônias foi contado e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia UFC por grama de tecido.

4.9.2 Análise histológica

Uma fração do pulmão foi acondicionada em tubos com tampão formalina 10% (Merck, Alemanha) e enviada para a realização da análise histopatológica (HE, masson´s trichrome e gomori's silver stain).

4.9.3 Caracterização das Citocinas: ELISA para a Quantificação de IL-4, IL-10, IL17, IL-23, TNF- α e IFN-γ

As dosagens de citocinas foram feitas, quantitativamente, por ELISA de captura (BD PharMingen, San Diego, CA), utilizando, como amostra, 0,5 mL de pulmão macerado em PBS. Esse volume foi ressuspendido em 0,5 mL de inibidor de proteases (Sigma-Aldrich), obtendo um volume final de 1 mL. Posteriormente, as

amostras foram centrifugadas a 4000 rpm/5min. Os sobrenadantes foram conservados a -80 ºC até serem utilizados. As placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 µL de anticorpos monoclonais (capture), *overnight* a 4 °C. As placas foram lavadas com PBS -Tween 20 0,05% (PBS – T) e bloqueadas com 200 µL de PBS-BSA 1%, por 1 h, a temperatura ambiente. Após nova lavagem, foram adicionadas as amostras (100 µL) e os padrões (citocinas recombinantes de camundongos – Pharmingen) e, em seguida, foram incubadas por 2 h, em temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e foram adicionados 50 µL do conjugado "Working detector (detection Ab + avidin-HRP)" em cada poço. Seguiu-se incubação por 1 h, à temperatura ambiente. Após nova lagagem, foram adicionados 50 µL do substrato (TMB substrate reagent set Pharmigen), e seguiu-se incubação à temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. A reação foi bloqueada com 25 µL de H_2SO_4 2N, e as leituras feitas em comprimento de onda de 450 nm (Multskan EX, USA). Os limites de detecção das citocinas foram: 7.8 pg/mL para IL-4, 31.25 pg/mL para IL-10 e IFN-γ, 15.6 pg/mL e para TNF-α.

As dosagens de IL-17 e IL-23 foram feitas quantitativamente por ELISA de captura (e Bioscience), utilizando placas de 96 poços (Corning Costar 9018). De acordo com as instruções do fabricante. O anticorpo de detecção e a enzima Avidin-HRP foram adicionados separadamente (100 µL/poço), com tempo de incubação de 1 h tanto para o anticorpo como para a enzima. Após incubação, as placas foram lavadas e foram adicionados 100 µL/poço do substrato (TMB substrate solution), em seguida foram incubadas durante 15 minutos, e posteriormente foram adicionados 50 µL/poço da solução de parada H_2SO_4 2 N. As leituras foram feitas em comprimento de onda de 450 nm (Multskan EX, USA). Os limites de detecção das citocinas foram: 30 pg/mL para IL-17 e 8 pg/mL para IL-23.

4.9.4 Obtenção de esplenócitos para imunofenotipagem

Após 8 dias da ultima imunização, os animais foram sacrificados, retirando-se o baço para determinar a presencia de células T de memoria e células Th17. O tecido foi macerado em meio RPMI estéril e as hemácias foram lisadas com 5 mL de solução salina 0.2% (4 ºC) durante 30 s. Posteriormente foram acrescentados 5 mL de solução salina 1,6% (4 ºC) para recuperar a isotonicidade. As células foram

contadas em Câmara de Neubauer e a viabilidade destas foi determinada utilizando-se o teste de exclusão com azul de Trypan, sendo que a viabilidade esteve sempre em torno de 90%.

4.9.5 Imunofenotipagem por citometría de fluxo

Os esplenócitos foram distribuídos em placas de 96 poços de fundo em "U", numa quantidade de 10^6 células/poço. Para a marcação de moléculas de superfície foram utilizados anticorpos anti-CD4 PerCP-Cy 5.5 (clone RM4-5, 2 µg/mL), anti-CD44 FITC (clone IM7, 2 µg/mL) para o fenótipo de memória. Para células do fenótipo Th17 foi utilizado anti-CD4 FITC (clone RM4-5, 6 µg/mL) como marcador de superfície. As células foram incubadas com os anticorpos durante 30 minutos a 4 ºC. Após este período, as células foram lavadas com PBS acrescido de 3% de Soro Fetal Bovino (PBS+3% SFB). As células com marcação para o fenótipo memoria (CD4/CD44) foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 1% e refrigeradas. Posteriormente, realizou-se a fixação e permeabilização das células marcadas com anti-CD4 FITC, para proceder à marcação para RORγt utilizando o anticorpo anti-RORγt (clone AFKJS-9, 2 µg/mL). A fixação e permeabilização foram realizadas utilizando o kit "Foxp3 Staining Buffer Set" (e-Bioscience), seguindo as instruções do fabricante. Como controle foram utilizadas células não marcadas e tubos FMO (fluorescence minus one), com os quais apresentam marcação para todas as moléculas de interesse menos uma delas (BAUMGARTH; ROEDERER, 2000). As células foram incubadas novamente por 30 minutos a 4 ºC e lavadas com 100 µL de "permeabilization buffer" (e-Bioscience). Após a lavagem, foram adicionados 200 µL de PFA 1% e procedeu-se a aquisição dos dados pelo citômetro de fluxo (FACSCanto II - BD, Bioscience). A análise das amostras adquiridas foi realizada utilizando o software FlowJo 7.2.4 (TreeStar).

4.10 Determinação do diâmetro médio, distribuição de tamanho, polidispersões e potencial Zeta para os complexos P10/ Adjuvante

O tamanho das partículas (média do diâmetro Dz), a distribuição de tamanho, a polidispersão e o potencial Zeta dos complexos formados pelos diferentes adjuvantes e pelo peptídeo (P10) foram determinados utilizando o *ZetaPlus*-

ZetaPotential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY). O equipamento dispõe de um laser de 677 nm e dinâmica de dispersão da luz (PCS) a 90° para o dimensionamento das partículas. O diâmetro médio foi obtido pelo ajuste dos dados numa lista de distribuição normal que abrange todas as partículas em dispersão como pertencentes a uma única população de Gauss. A distribuição do tamanho dos dados foi ajustada por meio de um software que utiliza um algoritmo de NNLS non-negatively constrained least squares, uma técnica independente que permite alcançar uma distribuição multimodal. O potencial Zeta (ζ) foi determinado a partir de mobilidade eletroforética (μ) em agua glicosada 287 mM glicose e a equação de Smoluchowski: $\zeta=\mu\eta/\varepsilon$, onde ($\eta$) indica a viscosidade do meio e (ε) representa a constante dielétrica do meio (LINCOPAN et al., 2009). Cada valor representa a media de até 20 medições individuais ± desvio padrão.

4.11 Análise estatística

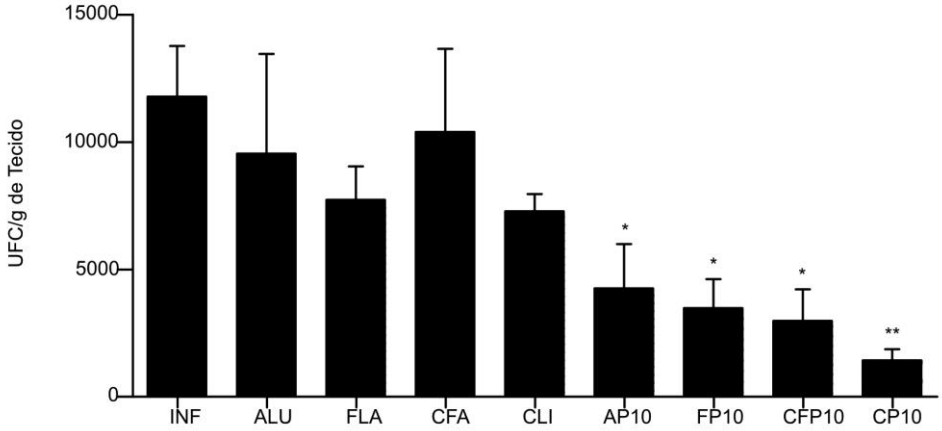
Os resultados de UFCs e os níveis de citocinas foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA). A analise de variância (ANOVA) foi realizada seguida do pós-teste de Tukey. Os valores de $p \leq 0.05$ indicam significância estatística.

5 RESULTADOS

5.1 Unidades formadoras de colônias dos camundongos BALB/c infectados e imunizados ou não, com peptídeo 10 (P10)

Após 30 dias de infecção, foram iniciadas as imunizações com 3 doses (uma por semana) de P10 associado ou não aos diferentes adjuvantes. Após 52 dias de infecção foi avaliado o grau de infecção, através das unidades formadoras de colônia, recuperadas dos órgãos (pulmão, baço e fígado). Observamos que nos pulmões de camundongos imunizados com P10 junto com os diferentes adjuvantes, o número de UFCs foi reduzido significativamente, em relação ao controle (Figura 2). Não foi observada disseminação do fungo para órgãos como o baço e o fígado nos grupos de animais que receberam imunizações com o P10 (dados não mostrados), demonstrando a efetividade do peptídeo no controle da Paracoccidioidomicose experimental. A carga fúngica foi de 625 ± 60 UFC/g de tecido nos baços e de 296 ± 59 UFC/g de tecido nos fígados dos animais controle infectados, não imunizados.

Figura 2 - Unidades Formadoras de Colônias de pulmão de camundongos BALB/c infectados i.t. com 3 x 10^5 células de *P. brasiliensis* e tratados nos dias 30, 37 e 44 após infecção com os diferentes adjuvantes, associados ou não com P10



Os animais foram sacrificados 52 dias após infecção. Foram utilizados, como controles, animais somente infectados e não-tratados (INF), animais infectados imunizados com alumen (ALU) ou com P10 (AP10), imunizados somente com FliC flagelina (FLA) ou associada com P10 (FP10), imunizados com adjuvante completo de Freund (CFA) ou com P10 (CFP10), imunização unicamente com lipídeo catiônico (CLI) ou com P10 (CP10). * p <0,05: diferença entre animais imunizados com o peptídeo associado com os adjuvantes e o controle (só infectado), ** p<0,01. Fonte: Mayorga et al., 2012.

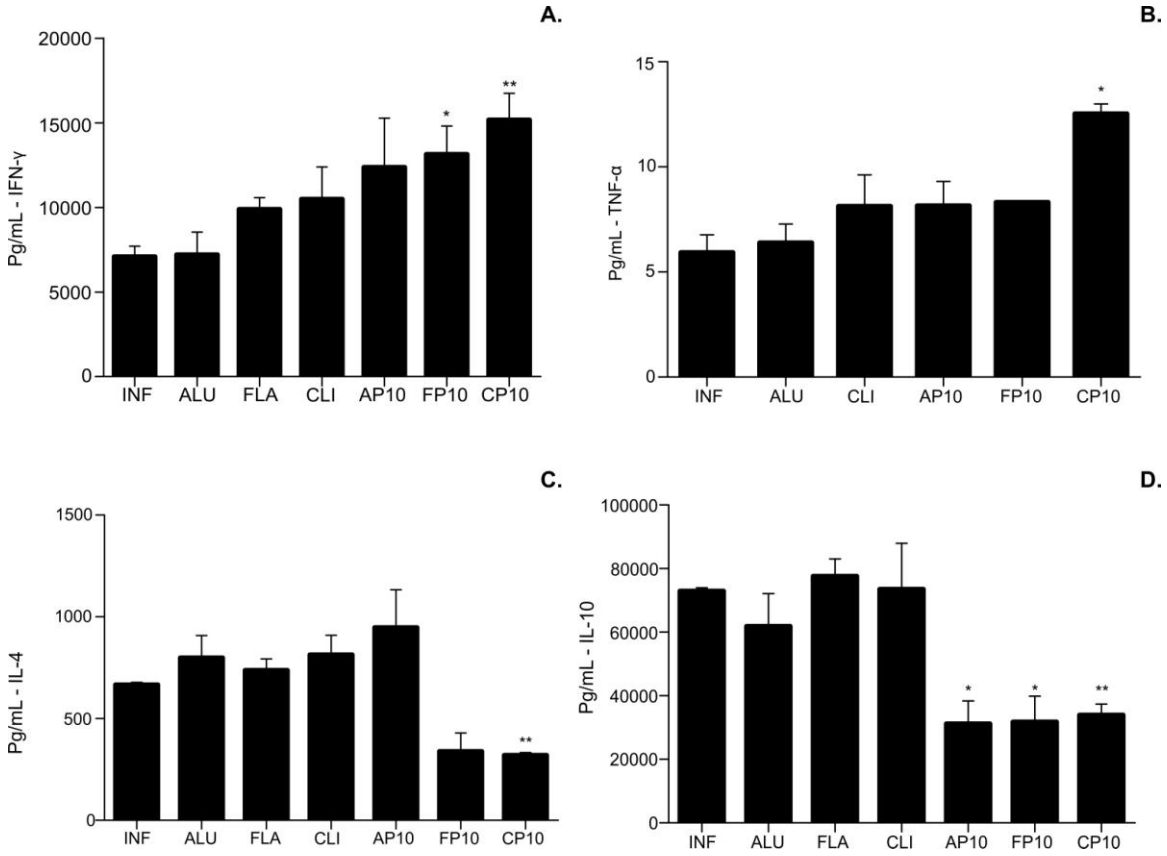
5.2 Quantificação das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL- 10 no homogeneizado de pulmão dos camundongos BALB/c infectados e imunizados com o P10

As dosagens de citocinas foram feitas, quantitativamente, por ELISA de captura (BD PharMingen, San Diego, CA), utilizando como amostra o macerado de pulmão, ressuspendido em inibidor de proteases (Sigma-Aldrich). Com o objetivo de verificar o perfil de resposta imune para cada um dos grupos imunizados com P10 junto com os adjuvantes, foram dosadas as citocinas TNF-α e IFN-γ, predominantes em respostas do tipo Th1 e as citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 (tipo Th2).

Em comparação com os animais controle (INF), IFN-γ teve um incremento significativo nos camundongos que receberam P10 associado com o lipídeo catiônico e com flagelina (Figura 3A), enquanto que os níveis de TNF-α só foram incrementados no grupo de camundongos imunizados com P10 e o lipídeo catiônico (Figura 3B). Com relação aos níveis de IL-4 (Figura 3C) e IL10 (Figura 3D), os animais imunizados com P10 junto com o lipídeo ou com FliC apresentaram uma redução significativa. Embora as imunizações com o peptídeo e Alumen também

tenham reduzido os níveis de IL-10, os níveis das outras citocinas analisadas não foram alterados.

Figura 3 - Detecção de citocinas no tecido pulmonar de camundongos BALB/c após 52 dias de infecção.



(A) IFN-γ, (B) TNF-α, (C) IL-4 e (D) IL-10. Cada grupo foi infectado i.t. com 3 x 10^5 células de *P. brasiliensis* e imunizados nos dias 30, 37 e 44 após infecção com os diferentes adjuvantes, associados ou não com P10. Os grupos de camundongos são: animais infectados não imunizados (INF), animais infectados e imunizados com alumen (ALU) ou com alumen + P10 (AP10), imunização somente com FliC flagelina (FLA) ou associada com P10 (FP10), imunização unicamente com lipídeo catiônico (CLI) ou com o lipídeo + P10 (CP10). * (p <0,05): diferença entre animais imunizados com o peptídeo associado com os adjuvantes e o controle (só infectado), ** p<0,01. Fonte: Mayorga et al., 2012.

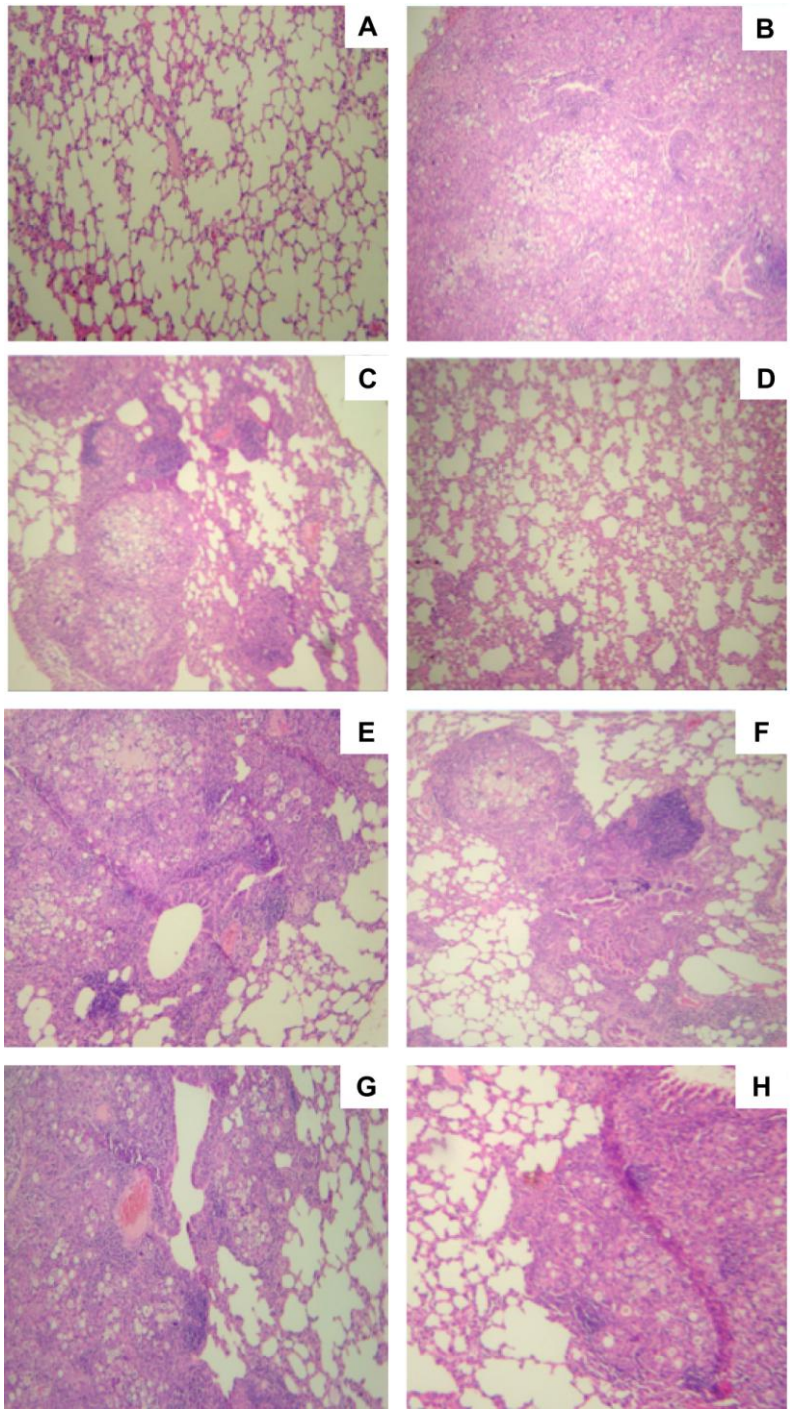
5.3 Histologia do pulmão de camundongos BALB/c infectados intratraquealmente com Pb18 e imunizados, ou não, com P10

Observa-se, na figura 4 a comparação da histopatología, pela coloração hematoxilina/eosina (HE), dos diferentes grupos imunizados e os grupos controle: no

grupo não infectado (Figura 4A) observa-se o tecido pulmonar conservado, enquanto que o grupo somente infectado (Figura 4B) apresenta um parênquima pulmonar comprometido com grande infiltrado celular e uma elevada quantidade de células fúngicas disseminadas pelo tecido. No caso dos camundongos imunizados só com lipídeo catiônico, observa-se a formação de granulomas frouxos com muitas células fúngicos (Figura 4C).

Nos pulmões de camundongos imunizados com P10 e Lipídeo catiônico observa-se um parênquima pulmonar conservado com ausência de células fúngicas (Figura 4D), quando comparados ao grupo somente infectado. No grupo de animais imunizados com flagelina associada ao P10 foi observada uma diminuição da carga fúngica nos pulmões, o parênquima pulmonar se encontra inflamado com formação de granulomas que evitam a disseminação do fungo, (Figura 4F). O grupo de camundongos imunizados com alumen associado ao P10 apresentou uma pequena redução do número de leveduras. Neste grupo, as leveduras se encontram disseminadas no tecido onde se observa a inflamação (Figura 4H).

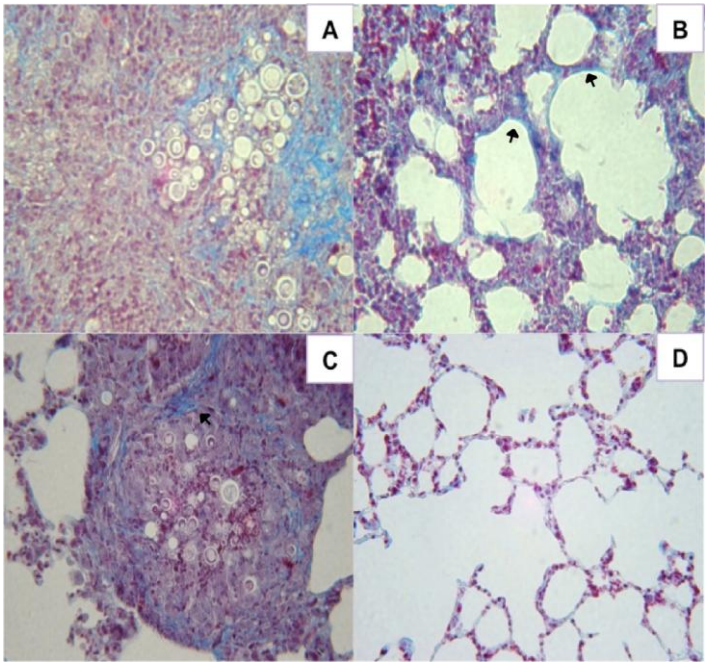
Figura 4 - Histopatología de pulmões de camundongos BALB/c infectados i.t., imunizados 30 dias após infecção com P10 associado ao lipídeo catiônico, FliC Flagelina e Alumen.



Os grupos de animais incluem: (A) grupo não infectado, (B) grupo infectado não imunizado, (C) infectado e imunizado com o lipídeo catiônico, (D) infectado e imunizado com o lipídeo catiônico + P10, (E) infectado e imunizado com FliC flagelina, (F) infectado e imunizado com FliC flagelina + P10, (G) infectado e imunizado com alumen, (H) infectado e imunizado com alumen + P10 após 52 dias de infecção. Coloração HE, 10X. Fonte: Mayorga et al., 2012.

Na figura 5, observa-se a histopatologia pulmonar, em coloração Masson´s trichrome, dos grupos infectados e imunizados com P10 associado com os adjuvantes, comparados com o grupo controle (somente infectado) onde podemos observar a elevada concentração de fibras de colágeno do tipo 1, com infiltrado de células e presença de células fúngicas (Figura 5A). No grupo de camundongos imunizado com P10 e o lipídeo catiônico observa-se o tecido pulmonar conservado com ausência de fibras de colágeno do tipo 1 e de células fúngicas (Figura 5D). Igualmente, as imunizações com P10 e FliC Flagelina (Figura 5B) mostraram a conservação do tecido pulmonar, com ausência de células fúngicas, mas com presença de fibras de colágeno, enquanto que o grupo de camundongos imunizado com P10 e alumen (Figura 5C) apresenta granulomas grandes contendo células fúngicas e a formação de fibras de colágeno na periferia do granuloma.

Figura 5 - Histopatología de pulmões de camundongos BALB/c infectados i.t., imunizados 30 dias após infecção com P10 associado ao lipídeo catiônico, FliC Flagelina e Alumen.

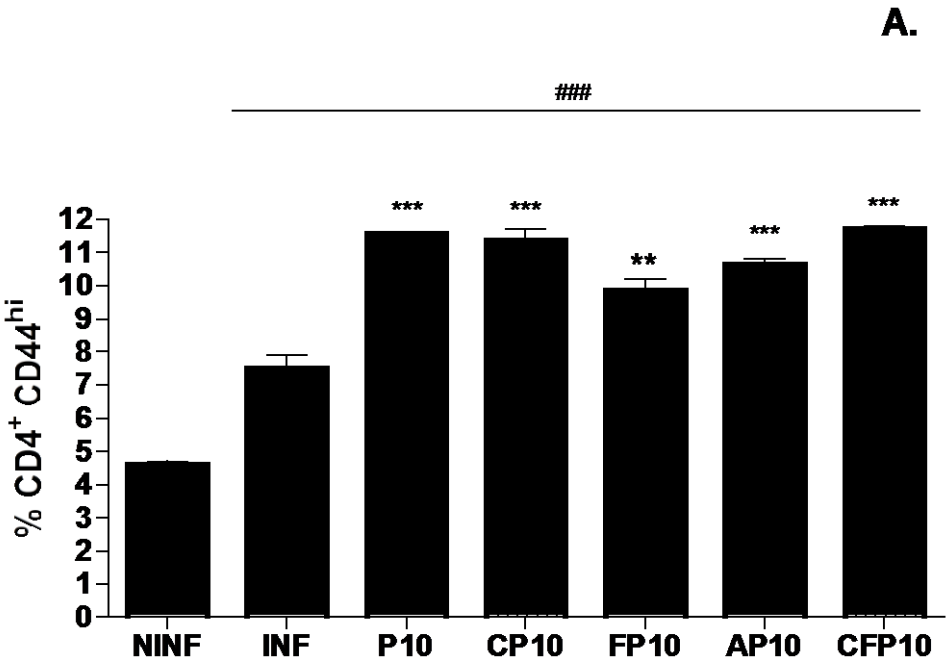


(A) Controle (somente infectado) (B) infectado e imunizado com Flic flagelina+P10, (C) infectados e imunizados com Alumen+P10, (D) Infectados e imunizados com lipídeo catiônico+P10. 52 dias de infecção. Coloração Masson´s trichrome, 40X. A coloração azul junto com as setas indicam a presença de fibras de colágeno do tipo I. Fonte: Mayorga et al., 2012.

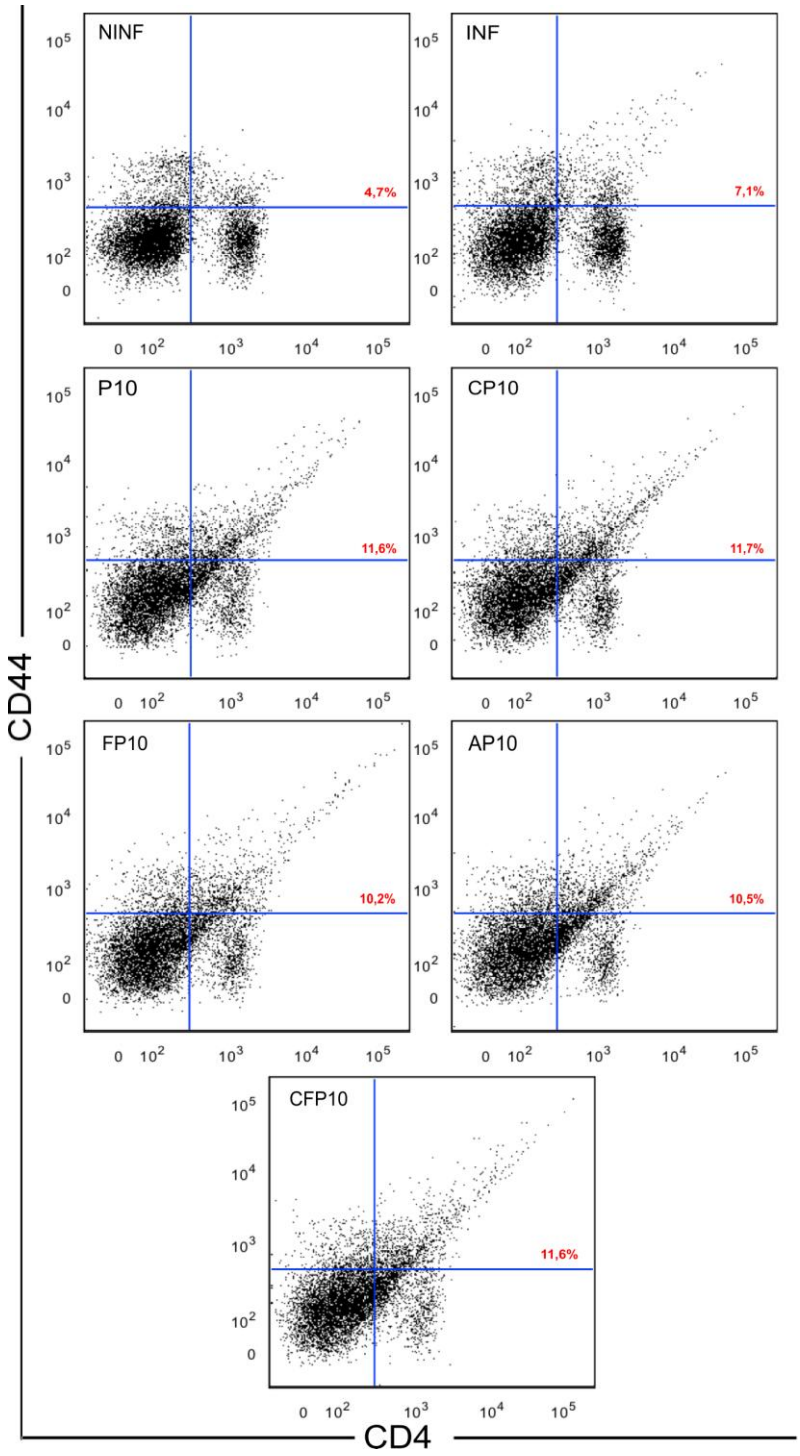
5.4 Caracterização de células T com fenótipo de memória no baço. Animais imunizados com o peptídeo P10 associado aos diferentes adjuvantes

Com o objetivo de identificar a geração de células de memória no baço dos animais que foram submetidos à imunização com o peptídeo P10, associado aos diferentes adjuvantes, foi utilizada a marcação para as moléculas CD4 e CD44 (DUTTON et al., 1998; GERBERICK et al., 1997). A marcação foi realizada após a obtenção dos esplenócitos. Os grupos de animais imunizados só com o peptídeo ou associado com os adjuvantes, diferem significativamente nas porcentagens de células T $CD4^{+}$ $CD44^{hi}$ com relação aos grupos controle (Figura 6).

Figura 6 - Caracterização de células T com fenótipo de memória $CD4^{+}$ $CD44^{hi}$.



B.

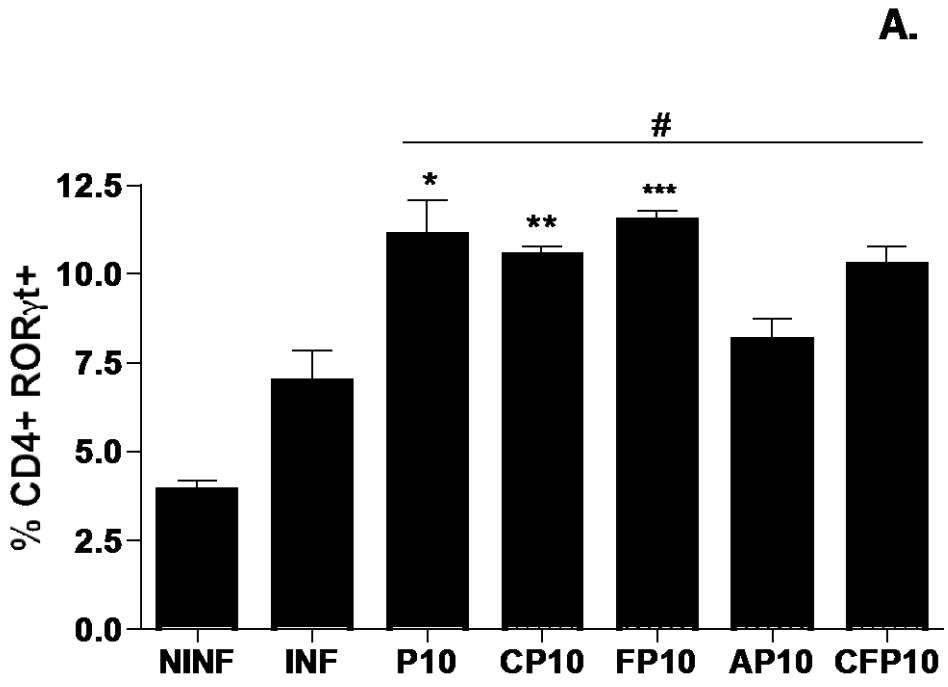


A. Porcentual de linfócitos do baço com fenótipo de memoria $TCD4^{+}$ $CD44^{hi}$ em camundongos imunizados com o peptídeo P10 (P10) associado com o lipídeo catiônico (CP10), Flagelina (FP10), Alumen (AP10) e adjuvante completo/incompleto de Freund (CFP10). Como controles foram usados esplenócitos de animais não infectados (NINF) e animais infectados não imunizados (INF). ### (p<0,001): relativo aos animais não infectados. **(p< 0,01) e *** (p< 0,001): relativos aos animais controle infectados, não imunizados. **B.** Gráficos de Dot Plot representam um dos experimentos realizados.

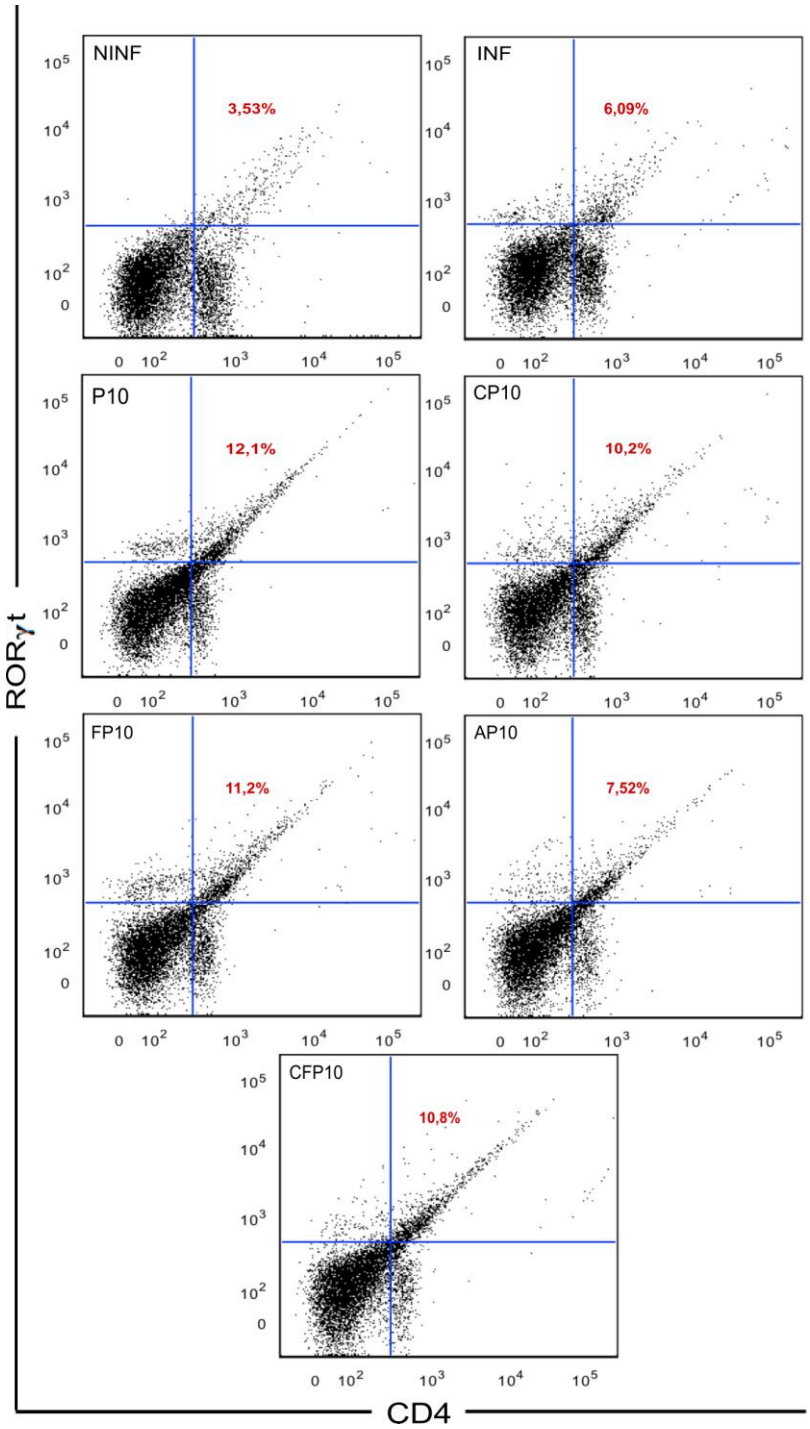
5.5 Caracterização de células T CD4$^+$/RORγt$^+$ no baço. Animais imunizados com o peptídeo P10 associado aos diferentes adjuvantes

Foi realizada a imunofenotipagem para caracterização de células Th17 dos esplenócitos provenientes dos animais imunizados com o P10 junto com os adjuvantes, para o qual foram usados os marcadores CD4 e RORγt. Houve um incremento significativo na geração de linfócitos T com fenótipo Th17 nos grupos de camundongos imunizados com o peptídeo P10, associado ou não, aos adjuvantes, isto quando comparados com o grupo de animais não desafiados (NINF). Os animais que foram imunizados com o peptídeo associado, tanto à flagelina como ao lipídeo catiônico, apresentaram um incremento significativo na porcentagem de linfócitos T CD4$^+$ RORγt$^+$, quando comparados com os animais controle (infectados, não imunizados), conforme é observado na figura 7.

Figura 7 - Caracterização de células T CD4$^+$ RORγt$^+$ no baço.



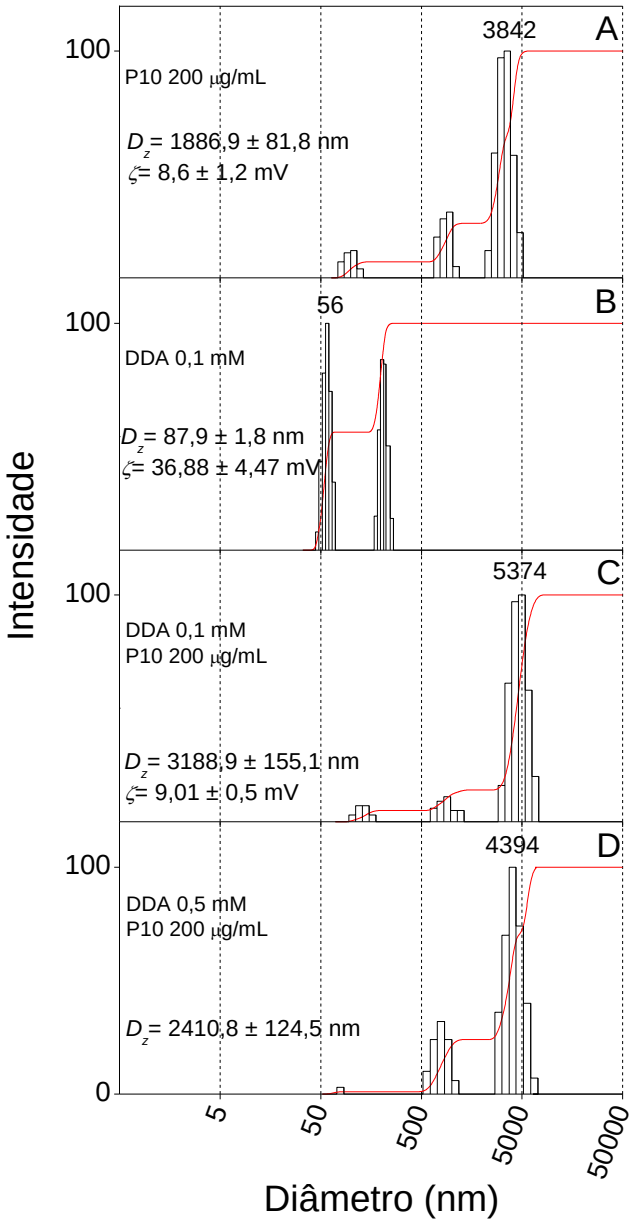
B.



A. Porcentual de linfócitos do baço com fenótipo Th17 $CD4^+$ $ROR\gamma t^+$ em camundongos imunizados com o peptídeo P10 (P10) associado com o lipídeo catiônico (CP10), Flagelina (FP10), Alumen (AP10) e adjuvante completo/ incompleto de Freund (CFP10). Como controles foram usados esplenócitos de animais não infectados (NINF) e animais infectados não imunizados (INF). # (p<0,001) relativo aos animais controle aos animais controle infectados, não imunizados. *(p< 0,05) ** (p< 0,01) e *** (p< 0,001) relativos aos animais não infectados. **B.** Gráficos de Dot Plot representam um dos experimentos realizados.

5.6 Análise de tamanho e potencial zeta dos adjuvantes associados com o peptídeo P10

Figura 8 - Distribuição de tamanho (Dz) e Potencial zeta (ζ) do lipídeo catiônico e o peptídeo P10 em dispersão.



As medidas foram obtidas após uma hora de interação entre DDA e P10 utilizando força iônica baixa em solução (287 mM glicose). As medições foram feitas no Zeta potential analyzer Brookhaven Istruments. Para cada ensaio foi usado um volume de 1.5mL cada medida corresponde a uma media de 10 medições ± o desvio padrão.

6 DISCUSSÃO

O peptídeo P10 (QTLIAIHTLAIRYAN) possui características imunoprotetoras importantes para o desenvolvimento de uma vacina terapêutica (TABORDA et al., 1998), e pode ser associado com drogas antifúngicas no tratamento da Paracoccidioidomicose. Marques et al. (2008) observaram o papel adjuvante do peptídeo na imunoproteção de camundongos infectados com *P. brasiliensis,* sugerindo sua utilização para melhorar a quimioterapia e prevenir a recidiva da doença.

A indução de uma resposta Th1 dominante é importante para o controle das infecções causadas por fungos, onde a produção de citocinas como IL-12, IFN–γ e TNF-α é indispensável para resolver este tipo de infecções (CUTLER; DEEPE; KLEIN, 2007). O efeito protetor do peptídeo está relacionado à indução da resposta imune tipo Th1 dependente de IFN-γ (TABORDA et al., 1998), o qual pode ser potencializado mediante associação com adjuvantes que permitam a captação eficiente pelas células dendríticas, levando ao incremento da apresentação do peptídeo para a geração da resposta imune celular (AMARAL et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2012).

A função imunoprotetora do peptídeo tem sido demonstrada inclusive em formulações que não requerem do CFA. A incorporação do P10 em nanopartículas de PLGA, associado ao tratamento com sulfametoxazol/trimetoprim levou a redução da carga fúngica em camundongos desafiados com *P. brasiliensis* (AMARAL et al., 2010). A aplicação de células dendríticas pulsadas com P10 é altamente efetiva no controle da infecção, mediante a produção de citocinas como IL-12 e IFN–γ e a redução dos níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4 (MAGALHÃES et al., 2012). Estes resultados foram também observados aplicando vetores plasmidiais contendo o inserto P10, corroborando o potencial do peptídeo como vacina (RITTNER et al., 2012).

Nos nossos resultados observamos uma redução significativa da carga fúngica nos pulmões de animais que receberam o peptídeo associado com os adjuvantes (Figura 2). A associação do lipídeo catiônico com P10 demonstrou uma maior eficácia na diminuição das UFC, sugerindo que, a formulação Lipídeo Catiônico/P10 pode gerar uma melhor resposta imune mediada por células do tipo Th1, caracterizada pela secreção da citocina IFN-γ, cuja produção foi

significativamente maior quando comparada com o controle (INF) (Figura 3A). A produção de IFN-γ é importante para a ativação de macrófagos peritoneais e pulmonares, com efeito fungicida, tanto para leveduras como para conídios do *P. brasiliensis* (BUISSA-FILHO et al., 2008; GONZALEZ et al., 2003).

Estudos realizados com o lipídeo catiônico, associado com proteínas recombinantes hsp de *Mycobacterium leprae*, demostram a habilidade do adjuvante na apresentação destes antígenos nas células dos linfonodos ao mesmo tempo que estimulam a produção de altos níveis de IL-12 e IFN-γ, o que sugere a importância do lipídeo catiônico na formulação de vacinas contra bactérias intracelulares, assim como, também pode ser utilizado em formulações contra protozoários (LINCOPAN et al., 2009)

A produção de IFN-γ é necessária para a síntese de TNF-α pelos macrófagos, sendo indispensável para o acúmulo dessas células e sua posterior diferenciação em células epitelióides. IFN-γ também é responsável pela formação e manutenção dos granulomas, favorecendo assim o controle na disseminação de *P. brasiliensis* (SOUTO et al., 2000).

Conforme é observado na figura 3B, os níveis de TNF-α aumentaram significativamente no grupo de animais imunizados com o lipídeo catiônico, associado ao P10, o que pode-se relacionar diretamente com a redução da carga fúngica nos pulmões, considerando que o efeito sinérgico entre IFN-γ e TNF-α é essencial para o desenvolvimento efetivo da atividade fungicida contra *P. brasiliensis* (FORTES et al., 2011)

Nas lesões granulomatosas da pele e mucosas de pacientes com PCM, a expressão de TNF-α encontra-se distribuída em de forma difusa na derme, sendo expressada nas células mononucleares do infiltrado inflamatório que rodeia o granuloma. As células dendríticas expressando TNF-α são arranjadas rodeando os granulomas, sugerindo o envolvimento precoce desta citocina após o contato do fungo com o hospedeiro (FORTES et al., 2011; PAGLIARI;SOTO, 2003; PARISE-FORTES et al., 2006).

Tem sido descrito que pacientes com a doença ativa apresentam deficiências na geração da resposta imune celular, caracterizada pela diminuição da síntese de citocinas do tipo Th1 e níveis elevados de IL-4, IL-5, IL10 e TGF-β, correspondentes ao padrão Th2. Estas citocinas tem um papel supressor da resposta imune celular, dificultando o controle da doença no hospedeiro (BENARD et al., 2001; KASHINO et

al., 2000).

Imunizações realizadas com P10 associado com drogas antifúngicas em animais infectados com o Pb18, induziram a redução significativa na produção de IL-4 (MARQUES et al., 2008). Nossos resultados também mostraram esta redução para as imunizações com P10 e o lipídeo catiônico (Figura 3C), assim como baixos níveis de IL-10 (Figura 3D). No entanto, dependendo do grau de inflamação gerado pela resposta Th1, as citocinas do tipo Th2 são essenciais para o balanço da resposta imune protetora, reduzindo a ocorrência de danos teciduais (TRAVASSOS et al., 2008).

Embora o lipídeo catiônico/P10 tenha demonstrado o melhor perfil de resposta, é importante considerar a função protetora do peptídeo P10 associado com FliC flagelina. Na figura 2, podemos observar a redução significativa no número de UFC, assim como o perfil de citocinas, que esta direcionado ao padrão de resposta pro-inflamatória, com produção significativa de IFN-γ (Figura 3A) e redução nos níveis de citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 (Figura 3C e 3D), contribuindo de maneira eficiente no controle da carga fúngica.

Imunizações por via intranasal, realizadas com FliC Flagelina na forma profilática, demonstraram a efetividade da associação deste adjuvante com o peptídeo P10 mediante a forte ativação da resposta imune dependente de células TCD4+, o que proporcionou o controle da infecção fúngica em modelo murinho de PCM. Esta estratégia vacinal induziu a níveis elevados de IFN-γ e IL-12 nas células pulmonares e á uma baixa produção de citocinas Th2 como IL-10 e IL-4 (BRAGA et al., 2009).

Com relação à função do alumen como adjuvante, foram observadas diminuições significativas no número de UFCs (Figura 2) assim como nos níveis de IL-10 (Figura 3D). A redução da carga fúngica usando alumen como adjuvante foi também observada por Marques (2007), neste trabalho foi feita a comparação entre os adjuvantes MPLA, alumen e CFA associados ao P10. O melhor resultado foi obtido com MPLA, seguido de alumen e CFA após 90 dias de infecção. O alumen estimula a produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10 pelas células Th2, sendo mais adequado para a indução da resposta imune humoral, com uma alta produção de anticorpos (REED et al., 2009). Em nossos estudos, apesar de termos observado uma redução nos níveis de IL-10, os níveis de IL-4 encontram-se similares aos do grupo controle (Figura 3C), assim como os níveis das citocinas pro-inflamatórias não

foram alterados de forma significativa (Figura 3A e 3B). Desta forma, é possível inferir que o efeito protetor do peptídeo não é potencializado quando encontra-se associado com o alumen.

A efetividade do peptídeo P10 tem sido demonstrada utilizando CFA como adjuvante (MARQUES et al., 2006; MARQUES et al., 2008; TABORDA et al., 1998). Nossos resultados corroboram com esses achados, onde foi observada redução significativa das células fúngicas nos pulmões dos camundongos desafiados com *P.brasiliensis* (Figura 2). Os mecanismos de ação do CFA permitem que a resposta induzida pelo P10 seja prolongada, evitando que o peptídeo seja metabolizado rapidamente. Além disso, a composição do CFA tem um efeito imunoestimulatório, participando na geração da resposta pro-inflamatória requerida para controlar a infecção de *P. brasiliensis.* Apesar das vantagens do CFA como adjuvante na PCM experimental, a sua aplicação é limitada para formulações vacinais em humanos e animais, devido aos possíveis efeitos colaterais, principalmente pela geração de granulomas nos locais de injeção.

A interação de *P. Brasiliensis* com o hospedeiro estimula a produção de citocinas como TNF-α pelas células fagocíticas, ocorrendo dano tecidual através da produção exacerbada de metabolitos intermediários do oxigênio, colagenase, ativação de moléculas de adesão e proliferação dos fibroblastos (FORTES et al., 2011). A análise histopatológica, com coloração por hematoxilina/eosina (HE), dos animais controle somente infectados (Figura 4B), mostrou um parênquima pulmonar comprometido, com infiltrado celular e presença de células fúngicas, enquanto que, nos animais imunizados com o Lipídeo catiônico/P10 foi observado um parênquima pulmonar mais conservado, com ausência de granulomas e de leveduras (Figura 4D).

A formação de granulomas compactos observados (Figura 4F) assim como os níveis de citocinas obtidos com FliC Flagelina/P10, pode estar associado á via de administração, considerando que as imunizações foram feitas pela via subcutânea, e de acordo com Braga et al. (2009), é possível obter um melhor resultado na resposta quando as imunizações são feitas pela via intranasal.

A fibrose pulmonar é uma sequela da PCM, causada provavelmente pelo estimulo antigênico persistente e a subsequente resposta imune, gerando uma alteração funcional dos pulmões, que inclusive pode aparecer após a terapia com

antifúngicos (NARANJO et al., 2010). Assim, é importante que os adjuvantes usados não induzam uma resposta imune exacerbada.

Estudos realizados com camundongos BALB/c infectados pela via intranasal com conídios de *P. brasiliensis* apresentaram um incremento progressivo da produção de fibras de colágeno do tipo I e III (reticulina). No período de 4 a 8 semanas após infecção, foi observada a formação de granulomas epiteliais compostos de células PMN, com presença de fibras finas de colágeno do tipo I localizadas no meio dos infiltrados celulares. As fibras de reticulina podem formar redes expandidas sobre as áreas inflamatórias, e aparecer também fragmentadas, ocupando a área central dos granulomas (RESTREPO et al., 1992). No nosso trabalho, foi realizada a coloração de masson´s trichrome para a identificação de fibras de colágeno do tipo I, as quais podem ser observadas de cor azul no grupo controle (Figura 5A), concentradas no infiltrado celular e próximas as células fúngicas.

A associação do lipídeo catiônico com P10 levou à diminuição da fibrose pulmonar dos camundongos infectados com Pb18 (Figura 5D) junto com a recuperação do tecido, contribuindo assim no desenvolvimento da resposta imunoprotetora contra paracoccidioidomicose experimental. Embora os grupos imunizados com alumen (Figura 5C) e FliC flagelina (Figura 5B) associados ao P10 tenham apresentado uma menor inflamação do tecido pulmonar, estes ainda apresentam uma pequena formação de fibras de colágeno, e no caso do alumen, com granulomas contendo células fúngicas.

Com o objetivo de estudar os fatores genéticos associados ao desenvolvimento da PCM e de estudar as diferenças da resposta imunológica entre as formas clinicas da doença, foi proposto um modelo experimental usando linhagens murinas geneticamente resistentes ou suscetíveis (CALICH et al., 1985). Camundongos da linhagem B10.A mostraram-se susceptíveis à infecção i.p. por *P. brasiliensis* sendo associado com a forma aguda da doença em humanos. Pelo contrario, camundongos A/Sn ou A/J foram resistentes à infecção, representando a forma crônica. O modelo experimental com camundongos da linhagem BALB/c, é um modelo crônico, considerando que estes encontram-se num estado intermediário, sendo capazes de controlar a infecção, embora não consigam atingir a cura (CALICH et al., 1985).

A aplicação desses modelos permitiram verificar a importância da resposta

imune celular na resistência à paracoccidioidomicose (CANO et al., 1995). Independente do padrão de susceptibilidade do hospedeiro, a carga fúngica é controlada principalmente por células TCD8, enquanto que a produção de anticorpos e reações de DTH são regulados pelas células TCD4 (CHIARELLA et al., 2007). Os linfócitos TCD4 desempenham um papel protetor em linhagens de resistência intermedia, como é no caso do nosso modelo experimental.

Após a apresentação dos antígenos aos linfócitos T *naive* nos orgãos linfoides, estes vão se diferenciar em células T efetoras, que depois da eliminação do patógeno vão entrar numa fase de contração ou morte, onde aproximadamente 90% destas células morrem por apoptose (KAECH; WHERRY; AHMED, 2002). As células que sobreviverem serão transformadas em células T de memória. Assim, as células T de memória podem ser definidas como qualquer célula T que já tenha encontrado o antígeno e esteja em uma fase pós-efetora (McKINSTRY; STRUTT; SWAIN, 2008). Ao contrário das células T *naive*, os linfócitos T de memória podem ser ativados por quantidades menores de antígeno (LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2001) e podem secretar uma variedade maior de citocinas.

O peptídeo P10 leva à proliferação de linfócitos T e direciona a resposta imune para o padrão Th1, que favorece o controle da infecção por *P. brasiliensis*, sendo um importante candidato vacinal. Considerando que a geração da memória imunológica a longo prazo é um aspecto importante no desenvolvimento de novas vacinas (ESSER et al., 2003), nós verificamos a geração de linfócitos T de memória nos animais imunizados com os diferentes adjuvantes, em associação com o peptídeo P10.

Em geral, as células T de memória são encontradas por períodos longos após exposição ao antígeno e estão presentes principalmente no sangue e no baço (DUTTON et al., 1998). Em camundongos, a imunofenotipagem de células de T de memória se dá através de moléculas de adesão. Assim, após a obtenção dos esplenócitos, a marcação foi realizada usando anticorpos específicos para as moléculas CD4 e CD44. Os resultados obtidos mostraram um incremento significativo das porcentagens de linfócitos $CD4^{+}CD44^{hi}$ nos grupos de animais imunizados somente com o peptídeo, ou como este associado aos adjuvantes (Figura 6). Este achado demonstra que o efeito do peptídeo na geração de células de memoria é independente dos adjuvantes estudados.

Por outro lado, a infecção por *P. brasiliensis* também está implicada na indução de populações de memória, tal como é observado no grupo de animais desafiados que não foram imunizados, os quais apresentam um incremento na porcentagem de linfócitos de memória, quando comparados com o grupo de animais que não foram infectados nem imunizados. A exposição a um agente infeccioso, normalmente promove um processo de memória imunológica, onde as respostas secundárias são mais intensas do que as respostas primárias (SPRENT; SURH, 2002).

Tem sido demonstrado que pacientes com PCM apresentam um incremento dos níveis de células de T de memória ($CD4^{+}CD45RO^{+}$) no PBMC, antes e depois do tratamento com drogas antifúngicas (BOZZI et al., 2007). Neste mesmo estudo, os autores argumentam que a geração de células de memória não é suprimida pela infecção e que estas células são mantidas, mesmo após do tratamento, por causa da presença de células fúngicas no organismo do paciente. Este mesmo processo imunológico pode ter acontecido no nosso experimento, onde o grupo controle desafiado, não imunizado encontra-se constantemente em contato com as leveduras de *P.brasiliensis.*

As células de memória típicas são relativamente quiescentes e precisam ser reativadas antes de expressar uma função efetora. Uma vez que entram em contato com um antígeno especifico, estas proliferam e estão prontas para desenvolver uma resposta efetora mais sólida, basicamente através da produção de citocinas específicas (SPRENT; SURH, 2001). Neste sentido, e de acordo com nossos resultados, a reativação das células de memória geradas após o desenvolvimento da resposta imune primaria contra *P. brasiliensis* foi induzida pelo peptídeo P10, o que levou à proliferação de células de memória ($CD4^{+}CD44^{hi}$) nos grupos de animais imunizados com as diferentes formulações.

Estudos usando o modelo murino tem demostrado que as células TCD4 podem desenvolver diferentes perfis de resposta dependendo de vários fatores, como a concentração de antígeno, o tipo de receptores que interagem com os antígenos assim como o tipo de citocinas produzidas. Esses perfis de resposta são conhecidos como Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Treg) (AFZALI et al., 2007).

As células Th17 são produtoras de citocinas IL-17 (A-F), IL-22 e IL-23, as quais são criticas para a expansão, manutenção e geração de uma resposta Th17, a qual tem um papel predominante na resposta imune protetora contra doenças como

candidíase tanto sistêmica (HUANG et al., 2004) quanto as de mucosas (CONTI et al., 2009), mediante a indução de fatores de ativação de neutrófilos, quimiocinas inflamatórias e proteínas antimicrobianas (YANO et al., 2012).

De acordo com nossos resultados, todos animais que receberam P10 tiveram um incremento da população de linfócitos Th17, quando comparados com o grupo de animais que não foram desafiados nem imunizados, indicando que possivelmente o peptídeo tenha um efeito estimulador da proliferação deste grupo de células. Isto considerando que o P10 é o único epítopo da gp43 responsável pela ativação de células TCD4 em camundongos BALB/c (TABORDA et al., 1998).

Entretanto, a porcentagem de células Th17 dos animais controle desafiados, mas que não foram imunizados, apresenta um leve incremento com relação aos animais não desafiados, isto devido provavelmente, ao fato de que os animais desafiados apresentam um desequilíbrio das respostas Th1/Th2, conforme é observado no perfil de citocinas (Fig. 3), onde há uma maior produção de citocinas anti-inflamatórias. No modelo experimental da aspergilose, tem sido observado que o incremento da resposta Th2 está associado à deficiências na sinalização do receptor da citocina IL-17A (IL-17RA), indicando que as células Th17 tem uma importante função reguladora, onde atuam como promotoras da resposta Th1, ao mesmo tempo que restringem a resposta anti-inflamatoria (ROMANI, 2011).

Na PCM experimental, tem sido demonstrada a importância dos receptores TLR2 e TLR4 no balanço da resposta imune celular. Enquanto que TLR2 inibe a ativação de Th17 e estimula o incremento de células Treg, o receptor TLR4 induz o aumento de células Th17, inibindo o desenvolvimento de células T reguladoras (LOURES et al., 2009; LOURES et al., 2010).

A imunidade mediada por células Th17 esta associada ao recrutamento de neutrófilos nos locais de inflamação. Em camundongos infectados com *P. brasiliensis* o incremento de citocinas Th17 é paralelo ao incremento de neutrófilos nos pulmões (LOURES et al., 2011). Assim, a polarização da resposta Th17 na PCM pulmonar está associada a reações inflamatórias ricas em células PMN, as quais são eficientes no controle da carga fúngica. No entanto, estas células também podem mediar efeitos nocivos, já que podem causar dano tecidual (LOURES et al., 2010).

Em nossos estudos foram realizados ensaios para a quantificação das citocinas IL-17 e IL-23 pelo método de ELISA, com o objetivo de verificar a

participação das células Th17 na resposta contra *P.brasiliensis.* No entanto, os resultados não permitiram determinar um padrão definido dos níveis destas citocinas entre os grupos de animais analisados (dados não mostrados). Desta forma, não foi possível inferir sobre a participação dos neutrófilos no controle da carga fúngica pulmonar.

Com relação aos adjuvantes, os animais que foram imunizados com o peptídeo associado, tanto à flagelina como ao lipídeo catiônico, apresentaram um incremento significativo na porcentagem de linfócitos T $CD4^+$ $ROR\gamma t^+$, quando comparados com os animais controle infectados, não imunizados. Em consequência, é possível deduzir que os adjuvantes podem potencializar o efeito indutor do P10 na proliferação de células Th17.

A flagelina é reconhecida pelo TLR5, o qual participa na indução rápida e transitória da transcrição dos genes de IL-17 e IL-22 nos tecidos linfoides, intestino, assim como nos tecidos pulmonares mediante ativação das células CD3-CD127+ (VAN MAELE et al., 2010). Os autores argumentam que esta resposta também ativam temporalmente a expressão de genes associados com a resposta Th17 e destacam a participação das células dendríticas no desenvolvimento desta resposta.

Uma das principais vantagens dos adjuvantes catiônicos consiste na sua habilidade em apresentar antígenos de carga oposta. Do ponto de vista físico-químico, a formação e fragmentos catiônicos em bicamada (bicelas) é um modelo versátil para apresentação de qualquer antígeno, uma vez que duas principais forças de interação podem ser exploradas: a hidrofobicidade e a interação eletrostática entre moléculas de carga oposta.

Os antígenos proteicos podem exibir porções substanciais de domínios hidrofóbicos em alfa-hélice, que serão propensos a interagir com as bordas hidrofóbicas do lipídeo. Por outro lado, a superfície catiônica das bicelas pode incorporar resíduos carregados negativamente. Esta propriedade já tem sido explorada na formulação de vacinas utilizando antígenos de *Mycobacterium leprae* e *Taenia crassiceps*, mostrando sua efetividade imunomoduladora, mediante a estimulação da resposta celular e humoral (LINCOPAN et al., 2009).

De acordo com o potencial zeta (ζ) calculado na suspensão do peptídeo em água glicosada, o peptídeo P10 apresenta carga positiva (Figura 8A), indicando que a interação entre os fragmentos do lipídeo catiônico e o P10 ocorre através de ligações hidrofóbicas, possivelmente pelos resíduos de isoleucina (I), Leucina (L),

Tironosina (Y), treonina (T), alanina (A), histidina (H), que fazem parte da estrutura do P10. A dinâmica da formação do complexo P10/lipídeo catiônico (DDA) pode ser evidenciada pela mudança nos valores da media do diâmetro e do potencial zeta, conforme é observado na figura 8.

A maior adição de lipídeo catiônico (0,5 mM) para uma concentração fixa de P10 (200 µg/mL) resulta na redução do tamanho dos complexos com aumento da carga, o que demonstra o predomínio do lipídeo catiônico no sistema (Figura 8D). Com relação às imunizações, a menor concentração de lipídeo incorporado é a mais indicada para prevenir efeitos citotóxicos, assim como a geração de uma resposta pro-inflamatória exacerbada.

Neste sentido, a melhor condição físico-química é apresentada na figura 8C, utilizando uma concentração baixa de lipídeo catiônico (0,1 mM), a qual foi incorporada totalmente no P10. Na figura 8D, pode ser observada uma redução do tamanho do complexo P10/lipídeo catiônico. Embora o potencial zeta não tenha sido determinado para este complexo, é provável que a carga positiva tenha incrementado. Porém, em concentrações maiores de lipídeo catiônico é possível a ocorrência de uma mudança na polidispersão do complexo, levando à diminuição gradual do tamanho até atingir um diâmetro medio aproximado de 90 nm, correspondendo a uma maior população de fragmentos numa condição de saturação de P10.

Por outro lado, as partículas lipídicas catiônicas asseguram que tanto o antígeno como o adjuvante possam interatuar com o mesmo grupo de APCs, limitando a distribuição sistémica do adjuvante e minimizando os possíveis efeitos adversos (O'HAGAN; SINGH, 2003). A atividade imunogénica dos complexos pode estar relacionada com o tamanho, considerando que partículas maiores (500-5000 nm) são predominantemente captadas por fagocitose, principalmente pelos macrófagos, enquanto que as de menor tamanho (20-200 nm) são captadas com maior facilidade pelas células dendríticas (FIFIS et al., 2004; O'HAGAN; MACKICHAN; SINGH, 2001).

As partículas catiônicas são captadas efetivamente tanto pelos macrófagos como pelas células dendríticas, devido á interação eletrostática que promove a ligação das partículas e a subsequente internalização (LINCOPAN et al., 2009). Nos nossos resultados, media do diâmetro do peptídeo é próxima a 1886,9 nm, enquanto que em associação com o lipídeo catiônico, o diâmetro foi próximo a 3188,9 nm.

Esses dados nos permitem inferir que o P10 associado ou não, com o lipídeo catiônico, pode-se ligar preferencialmente aos macrófagos, os quais vão apresentar o antígeno aos linfócitos TCD4 para a geração da resposta inflamatória, levando ao controle da infecção por *P. brasiliensis* no modelo experimental.

7 CONCLUSÕES

- Verificamos que animais imunizados com o peptídeo P10 associado ao lipídeo catiônico, FliC flagelina, CFA/IFA e Alumen reduziram significativamente a carga fúngica dos pulmões. Entretanto, observamos que o P10 associado ao lipídeo catiônico foi mais eficaz no controle da carga fúngica;

- o peptídeo P10 associado com o lipídeo catiônico induz produção elevada de IFN-γ e TNF-α, o qual sugere que a resposta imune desenvolvida é mediada possivelmente por células Th1;

- os pulmões de animais imunizados com lipídeo catiônico e P10 apresentaram parênquima pulmonar conservado, com diminuição significativa de células fúngicas e de fibrose, como consequência de uma melhor modulação da resposta imune quando comparado com alumen e flagelina;

- o efeito do peptídeo P10 na geração de células de memória é independente do adjuvante com que esteja associado. Enquanto que na geração de células Th17, o estimulo induzido pelo P10 é potencializado quando associado á FliC flagelina e ao lipídeo catiônico;

- a interação entre os fragmentos do lipídeo catiônico e o P10 ocorre através de ligações hidrofóbicas;

- o amanho do complexo P10/lipídeo catiônico permite a ligação com as células apresentadoras de antígeno, principalmente com macrófagos.

REFERÊNCIAS*

AFZALI, B.; LOMBARDI, G.; LECHLER, G. R. I.; LORD, G. M. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. British Society for Immunology. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 148, p. 32–46, 2007.

ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia,** v. 9, p. 248-253, 1971.

ALMEIDA O. P.; JACKS JR. J.; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis Review. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med**., v. 14, p. 377-383, 2003.

ALMEIDA, S. R.; UNTERKIRCHER, C. S.; CAMARGO, Z. P. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 405–411, 1998.

AMARAL, A. C.; MARQUES, A. F.; MUÑOZ, J. E.; BOCCA, A. L.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; MORAIS, P. C.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P.; FELIPE, M. S. 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.

AMEEN, M.; TALHARI, C.; TALHARI, S. Advances in paracoccidioidomycosis. **Clin. Exp. Dermatol.,** v. 35, p. 576-580, 2010.

AMORIM, J. **Geração de células T de memória e linfócitos T reguladores em camundongos BALB/c vacinados com vetor plasmidial contendo o inserto P10 de *Paracoccidioides brasiliensis***. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BAGAGLI, E.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M. G.; McEWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia,** v. 165, p. 197-207, 2008.

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 noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v. 58, p. 505-512, 1998.

BARROZO, L. V.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; BENARD, G.; SILVA, M. E.; BAGAGLI, E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. **Int. J. Epidemiol.,** v. 38, p. 1642-1649, 2009.

*De acordo com:
ASSOCIAÇAO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referencias: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BAUMGARTH, N.; ROEDERER, M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. **J. Immunol. Met.**, v. 243, p. 77-97, 2000.

BAYLOR, N. W.; EGAN, W.; RICHMAN, P. Aluminum salts in vaccines US perspective. **Vaccine**, v. 20, p. 18–23, 2002.

BENARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE C. R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE, A. J. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, p. 248-252, 2001.

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.

BLOTTA, M. H.; MAMONI, R. L.; OLIVEIRA, S. J.; NOUER, S. A.; PAPAIORDANOU, P. M.; GOVEIA, A.; CAMARGO, Z. P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brasil: clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am. J. Trop. Méd. Hyg**., v. 61, p. 390-394, 1999.

BOZZI, A.; REIS, B. S.; GOULART, M. I.; PEREIRA, M. C. N.; PEDROSO, E. P.; GOES, A. M. Analysis of memory T cells in the human paracoccidioidomycosis before and during chemotherapy treatment. **Immunol. Letters,** v. 114, p. 23-30, 2007.

BRAGA, C. J. M.; RITTNER, G. M. G.; MUÑOZ, J. E.; TEIXEIRA, A. F.; MASSIS, L. M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; TABORDA, C. P.; TRAVASSOS, L. R.; FERREIRA, L. C. S. *Paracoccidioides brasiliensis* Vaccine Formulations Based on the gp43-Derived P10 Sequence and the *Salmonella enterica* FliC Flagellin. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 1700-1707, 2009.

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

BUISSA-FILHO, R.; PUCCIA, R.; MARQUES, A. F.; PINTO, F. A.; MUÑOZ, J. E.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 3321-3328, 2008.

CADAVID, D.; RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiol. Infect.,** v. 111, p. 121–133, 1993.

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. Pathol.**, v. 66, p. 585-594, 1985.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev. Iberoam. Micol**., v. 17, p. 41-48, 2000.

CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S. P.; TRAVASSOS, L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J. Clin. Microbiol**., v. 26, p. 2147-2151, 1998.

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

CASTAÑEDA, E.; BRUMMER E.; PERLMAN A. M.; MACEWEN 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.

CHANG, J. C. C.; DIVELEY, J. P.; SAVARY, J. R; JENSEN, F. C. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. **Adv. Drug Del. Rev.,** v. 32, p. 173–186, 1998.

CHIARELLA, A. P.; ARRUDA, C.; PINA, A.; COSTA, T. A.; FERREIRA, R. C.; CALICH, V. L. The relative importance of CD4+ and CD8+T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mic. Inf.**, v. 9, p. 1078-1088, 2007.

CONTI, H. R.; SHEN, F.; NAYYAR, N.; STOCUM, E.; SUN, J. N.; LINDEMANN, M. J.; HO, A. W.; HAI, J. H.; YU, J. J.; JUNG, J. W.; FILLER, S. G.; MASSO-WELCH, P.; EDGERTON, M.; GAFFEN S. L.Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. **J. Exp. Med.,** v. 206, p. 299–311, 2009.

CORREDOR, G. G.; CASTAÑO, J. H.; PERALTA, L. A.; DÍEZ, S.; ARANGO, M.; MCEWEN, J.; RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo Dasypus novemcinctus, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev. Iberoam. Micol**., v. 16, p. 216-220, 1999.

CUADROS, C.; LOPEZ-HERNANDEZ, F. J.; DOMINGUEZ, A. L,; MCCLELLAND, M.; LUSTGARTEN, J. Flagellin Fusion Proteins as Adjuvants or Vaccines Induce Specific Immune Responses. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2810-2816, 2004.

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

DONNELLY, J. J. New developments in adjuvants. **Mechan. Age. Dev.**, v. 93, p. 171–177, 1997.

DUTTON, R. W.; BRADLEY, L. M.; SWAIN, S. L. T cell memory. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 201-223, 1998.

ESSER, M. T.; MARCHESE, R. D.; KIERSTEAD, L. S.; TUSSEY, L. G.; WANG, F.; CHIRMULE, N.; WASHABAUGH, M. W. Memory T cells and vaccines. **Vaccine**, v. 21, p. 419-430, 2003.

FERREIRA, M. S.; FREITAS, L. S.; LACAZ, C. S.; DEL NEGRO, G. M.; AIELO, N. T.; GARCIA, M. N.; ASSIS, C. M.; SALEBIAN, A.; HEINS-VACCARI, E. M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from dog food probaly

contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.,** v. 38, p. 253–256, 1990.

FIFIS, T.; GAMVRELLIS, A.; CRIMEEN-IRWIN, B.; PIETERSZ, G. A.; LI, J.; MOTTRAM, P. L.; MCKENZIE, I. F.; PLEBANSKI, M. Size-Dependent Immunogenicity: therapeutic and protective properties of nanovaccines against tumors. **J. Immunol.**, v. 173, p. 3148–3154, 2004.

FORTES, M. R. P.; MIOT, H. A.; KUROKAWA, C. S.; MARQUES, M. E. A.; MARQUES, S. A. Immunology of paracoccidioidomycosis**. An. Bras. Dermatol.,** v. 86, p. 516-524, 2011.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**., v. 20, p. 129-132, 1987.

FRANCO, M. Host parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol**., v. 25, p. 5-18, 1987.

GERBERICK, G. F.; CRUSE, L. W.; MILLER, C. M.; SIKORSKI, E. E.; RIDDER, G. M. Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment. **Toxicol. Applied Farmacol**., v. 146, p. 1-10, 1997.

GEZUELE, E. Aislamiento de Paracoccidioides sp. de heces de pinguino de la Antártida. In: PROCEEDINGS IV INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS, 4., 1989, Caracas, Venezuela. **Resumos...** Caracas, Venezuela: Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas (IVIC), 1989. p. B-2.

GOLDANI, L. Z.; PICARD, M.; SUGAR, A. M. Synthesis of heat-shock proteins in mycelia and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Microbiol**., v. 40, p. 124-128, 1994.

GONZÁLEZ, A.; SAHAZA, J.H.; ORTIZ, B.L.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Production of proinflammatory cytokines during the early stages of experimental Paracoccidioides brasiliensis infection. **Med. Mycol.,** v. 41, p. 391**-**399, 2003.

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, p. 124-125, 1965.

GUPTA, R. K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 32, p. 155–172, 1998.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence Factors of Medically Important Fungi. **Clin. Microb. Rev.**, v. 9, p. 469–488, 1996.

HOGENESCH, H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. **Vaccine,** v. 20, p. 34–39, 2002.

HUANG, W.; NA, L.; FIDEL, P. L.; SCHWARZENBERGER, P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. **J. Infect. Dis**., v. 190, p. 624-631, 2004.

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. CUNHA-NETO, E. 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.

KAECH, S. M.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Effector and memory T-cells differentiation: implications for vaccine development. **Nat. Ver.,** v. 2, p. 251-262, 2002.

KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L. H.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; SINGER, L. M.; CALICH, V. L. G. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-g production. **J. Interf. Cytok. Res**, v. 20, p. 89–97, 2000.

KENNEY, R. T. AND EDELMAN, R. Survey of human-use adjuvants. **Exp. Rev. Vacc.,** v. 2, p. 167**–**188, 2003.

KONNO, A. Y.; MARICATO, J. T.; KONNO, F. T.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* GP43 inhibit macrophage functions and inflammatory response. **Microb. Inf.,** v. 11, p. 92-99, 2009.

KWAK, L. W.; LONGO, D. L. Modern vaccine adjuvants. In: CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. (Ed.). **Cancer chemotherapy and biotherapy.** Philadelphia, PA: Lippincott–Raven, 1996. p. 749–763.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier Publishers, 2002. p. 639-729.

LACAZ, C. S.; ZAMITH, V. A.; DEL NEGRO, G.; SIGUIERA, A. M. Aspectos clínicos gerais: formas polares da Paracoccidioidomicose: Particularidades clínicas, infanto-juvenis. In: DEL NEGRO, G.; LCAZ, C. S.; FIORILLO, A. M. (Ed.). **Paracoccidioidomicoses**: blastomicose sul-americana. São Paulo: Savier Editora, 1982. p. 141-147.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 487-492, 2001.

LIEN, E.; GOLENBOCK, D. T. Adjuvants and their signaling pathways: beyond TLRs. **Nat. Immunol**., v. 4, p.1162–1164, 2003.

LINCOPAN, N.; SANTANA, M. R. A.; FAQUIM-MAURO, E.; DA COSTA M. H. B.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Silica-based cationic bilayers as immunoadjuvants. **BMC Biotechnol**., v. 9, p. 1-19, 2009.

LINCOPAN, N.; ESPÍNDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Cationic supported lipid bilayers for antigen presentation. **Int. J. Pharm.,** v. 340, p. 216–222, 2007.

LINDBLAD E. B. Freund's adjuvants. In: Methods in molecular medicine: vaccine adjuvants. In: O'HAGAN, D. T. (Ed.). **Preparation methods and research protocols**. Totowa NJ: Humana Press, 2000. p. 49-63.

LORTHOLARY, A. O.; DENNINGB, D. W.; DUPONT C. B. Endemic mycoses: a treatment update. **J. Antimicrob. Chem.,** v. 43, p. 321–331, 1999.

LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M.; FERIOTTI, C.; DE ARAÚJO, E. F.; CALICH, V. L. MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Infect. Immun.,** v. 79, p. 2470-2480, 2011.

LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M.; ARAUJO, E. F.; CALICH, V. L. G. TLR4 signaling leads to a more severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infect. Immun.,** v. 78, p. 1078–1088, 2010.

LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M.; CALICH, V. L. G. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J. Immunol**., v. 183, p. 1279–1290, 2009.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localisada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hypo-blastomycoses americanas. **Brazil Méd.,** v. 22, p. 141-144, 1908.

MAGALHÃES, A.; FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin. Vaccine Immunol.,** v. 19, p. 23-29, 2012.

MARCIANI, D. J. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. **Drug. Dicov. Today**, v. 8, p. 934-943, 2003.

MARQUES, A. F.; SILVA, M. B.; JULIANO, M. A. P.; MUNHÕZ, 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*. **Microb. Infect.**, v. 10, p. 1251-1258, 2008.

MARQUES, A. F. **Utilização de peptídeo sintético (P10) associado ao tratamento com drogas no controle da paracoccidioidomicose experimental**. 2007. 158 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MARQUES, A. F.; DA SILVA M. B.; JULIANO, M. A. P.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Peptide immunization as an adjuvant to chemoterapy in mice challenged intratraqueally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrob. Agents Chemother**., v. 50, p. 2814-2819, 2006.

MARQUES DA SILVA S. H.; QUEIROZ-TELLES, F.; COLOMBO, A. L.; BLOTTA, M. H.; LOPES, J. D.; PIRES DE CAMARGO, Z. Monitoring gp43 antigenemia in paracoccidioidomycosis patients during therapy. **J. Clin. Microbiol.,** v. 42, p. 2419–2424, 2004.

MAYORGA, O.; MUÑOZ, J. E.; LINCOPAN, N.; TEIXEIRA, A. F.; FERREIRA, L. C.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. The role of adjuvants in therapeutic protection against paracoccidioidomycosis after immunization with the P10 peptide. **Front. Microbiol.,** v. 3, n. 154, p. 1-6, 2012.

McEWAN, J. G.; BEDOYA, V.; PATIÑO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidiodomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol**., v. 25, p. 165-175, 1987.

McKINSTRY, K. K.; STRUTT, T. M.; SWAIN, S. L. The effector to memory transition of CD4 T cells. **Immunol. Res.,** v. 40, p. 114-127, 2008.

MENDES, E.; RAPHAEL, A. Impaired delayed hypersensitivity in patients with South American blastomycosis. **J. Allergy**, v. 47, p. 17-22, 1971.

MENEZES, V. M.; SOARES, B. G.; FONTES, C. J. F. Drugs for treating paracoccidioidomycosis. **Cochrane Database Syst. Rev**., n. 2, p.1-16, 2009.

MONTENEGRO, M. R.; MIYAJI, M.; FRANCO, M.; NISHIMURA, K.; COELHO, K. I.; HORIE, Y.; MENDES, R. P.; SANO, A.; FUKUSHIMA, K.; FECCHIO, D. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, state of Sao Paulo, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**., v. 91, p. 665–670, 1996.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology. In: Paracoccidioidomycosis. FRANCO M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A. M.; DEL NEGRO, G. (Ed.). London: C. R. C. Press, 1994. p. 131–150.

MURTHY, K. G.; DEB, A.; GOONESEKERA, S.; SZABO, C.; SALZMAN A. L. Identification of Conserved Domains in *Salmonella muenchen* Flagellin That Are Essential for Its Ability to Activate TLR5 and to induce an Inflammatory Response in Vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 5667–5675, 2004.

NAKAIRA-TAKAHAGI, E.; GOLIM, M. A.; BANNWART, C. F.; PUCCIA, R. M.; PERAÇOLI, M. T. S. Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes**. Med. Mycol.**, v. 49, p. 694–703, 2011.

NARANJO, T. W.; LOPERA, D. E.; DIAZ-GRANADOS, L.; DUQUE, J. J.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Combined itraconazole-pentoxifylline treatment promptly reduces lung fibrosis induced by chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in mice. **Pulm. Pharmacol. Ther.,** v. 24, p. 81-91, 2010.

NEGRONI, P. The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina. **Pren. Med. Argent.,** v. 53, p. 2381-2382, 1966.

O'HAGAN D. T.; SINGH, M.; HULMER, J. B. Microparticles for the delivery of DNA vaccines: review. **Immunol. Rev.,** v. 199, p. 191-200, 2004.

O'HAGAN D. T.; SINGH, M. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. **Expert. Rev. Vaccines.,** v. 2, p. 269–283, 2003.

O'HAGAN, D. T.; MACKICHAN, M. L.; SINGH, M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. Immunol. **Biomol. Eng**., v. 18, p. 69–85, 2001.

O'HAGAN, D. T.; JEFFERY, H.; ROBERTS, M. J.; MCGEE, J. P.; DAVIS, S. S. Controlled reléase microparticles for vaccine development. **Vaccine**., v. 9, p. 768–771, 1991.

PAGLIARI, C.; SOTTO, M. N. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. **Am. J. Dermatopathol**., v. 25, p. 107-112, 2003.

PARISE-FORTES, M. R.; MARQUES, S. A.; SOARES, A. M.; KUROKAWA, C. S; MARQUES, M. E.; PERACOLI, M. T. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. **Br. J. Dermatol.,** v. 154, p. 643-650, 2006.

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

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, p. 513-521, 2009.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*. Identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, v. 53, p. 193-203, 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. Microb.**, v. 29, p. 1610-1615, 1991.

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

REED, S. G.; BERTHOLET, S.; RHEA, N.; COLER, R. N.; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immun.,** v. 30, p. 23-32, 2009.

RESTREPO, A.; BERNARD, G.; DE CASTRO, C.; AGUDELO, C.; TOBÓN, A. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Semin. Respir. Crit. Care Med**., v. 29, p. 182-197, 2008.

RESTREPO, A.; McEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat *of Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.,** v. 39, p. 233-241, 2001.

RESTREPO-MORENO, A. Paracoccidioidomycosis. In: DISMUKES, W. E.; PAPPAS, P. G; SOBEL, J. (Ed.). **Clinical mycology**. New York: Oxford University Press, 2003. p. 328-345.

RESTREPO, S.; TOBON, A.; TRUJILLO, J.; RESTREPO, A. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 173-184, 1992.

RITTNER, G. M. G.; MUÑOZ, J. E.; MARQUES, A. F.; NOSANCHUK, J. D.; TABORDA, C. P.; TRAVASSOS, L. R. Therapeutic DNA Vaccine Encoding Peptide P10 against Experimental Paracoccidioidomycosis. **Plos Neg. Trop. Dis.**, v. 6, p. 1519-1529, 2012.

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

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat. Rev. Immunol**., v. 11, p. 275–288, 2011.

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 Púb.**, v.19, p. 245-253, 2003.

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.

SARAIVA, E. C. O.; ALTEMANI, A.; FRANCO, M. F.; UNTERKIRCHER, C. S.; CAMARGO, Z. P. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used paracoccidioidin. **J. Méd. Vet. Mycol***.,* v. 34, p. 155-161, 1996.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES, F. F.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 39, p. 297-310, 2006.

SHIRODKAR, S.; HUTCHINSON, R. L.; PERRY, D. L.; WHITE, J. L.; HEM, S. L. Aluminum compounds used as adjuvants in vaccines. **Pharm. Res.**, v. 7, p. 1282–1288, 1990.

SHOME, S. K.; BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. **Rev. Fac. Med. Fed. Ceará**, v. 3, p. 90–94, 1963.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z. P.; MALTA, M. H.; MAFFEI, C. M.; CHADU, 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, p. 193-199, 2000.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; LEITE MAFFEI, C. M. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol.,** v. 36, p. 37-42, 1998.

SINGH, M.; BRIONES, M.; OTT, G.; O'HAGAN, D. Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines. **PNAS,** v. 97, p. 811–816, 2000.

SMITH, K. D.; ANDERSON-NISSEN, E.; HAYASHI, F.; STROBE, K.; BERGMAN, M. A.; RASSOULIAN BARRETT, S. L.; COOKSON, B. T.; ADEREM. A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. **Nat. Immunol**., v. 4, p. 1247–1253, 2003.

SOUTO, J. T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.,** v. 156, p. 1811-1820, 2000.

SPRENT, J.; SURH, C. D. T cell memory. **Annu. Rev. Immunol.,** v. 20, p. 551-579, 2002.

SPRENT, J.; SURH, C.D. Generation and maintenance of memory T cells. **Curr. Opin. Immunol.,** v. 13, p. 248–254, 2001.

STILLS, JR. H. F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **ILAR J.,** v. 46, p. 280-293. 2005.

TABORDA, C. P.; SILVA, M. B.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R. Melanin as a virulence factor of Paracoccdioides brasiliensis and other dimorphic pathogenic fungi: a mini review. **Mycopathologia**, v. 165, p. 331-339, 2008.

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.

TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen-gp43. **J. Med. Vet. Mycol**., v. 31, p. 155–160, 1993.

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

THIELE, L.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; JILEK, S.; WUNDERLI-ALLENSPACH, H.; MERKLE, H. P.; WALTER, E. Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? **J. Cont. Rel**., v. 76, p. 59–71, 2001.

TOBÓN, A. M.; AGUDELO, C. A.; OSORIO, M. L.; ALVAREZ, D. L.; ARANGO, M.; CANO, L. E.; RESTREPO, A. Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after itraconazole therapy. **Clin. Infect. Dis.,** v. 37, p. 898–904, 2003.

TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. New advances in the development of a vaccine against paracoccidioidomycosis. **Front. Microbiol**., v. 3, 2012. In press.

TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P.; COLOMBO, A. L. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. Expert Rev. **Anti. Infect. Ther.,** v. 6, p. 251-262, 2008.

VAN MAELE, L.; CARNOY, C.; CAYET, D.; SONGHET, P.; DUMOUTIER, L.; FERRERO, I.; JANOT, L.; ERARD, F.; BERTOUT, J.; LEGER, H.; SEBBANE, F,; BENECKE, A.; RENAULD, J. C.; HARDT, W. D.; RYFFEL, B.; SIRARD, J. C. TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. **J. Immunol.**, v. 185, p. 1177-1185, 2010.

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.

VIDARD, L.; KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M.; KRAEFT, S. K.; CHEN, L. B.; BENACERRAF, B.; ROCK, K. L. Analysis of MHC class II presentation of particulate antigens of B lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 156, p. 2809–2818, 1996.

WACK, A.; RAPPUOLI, R. Vaccinology at the beginning of the 21st century. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 17, p. 411**–**418, 2005.

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

YANO, J.; KOLLS, J. K.; HAPPEL, K. I.; WORMLEY, F.; WOZNIAK, K. L.; FIDEL JR, P. L. The Acute Neutrophil Response Mediated by S100 Alarmins during Vaginal

Candida infections is independent of the Th17-Pathway. **PLoS ONE**, v. 7, p. e46311, 2012.

ZHOU, E. M.; AFSHAR, A. Comparison of Freund´s adjuvant and TiterMax™ in inducing anti-idiotype to idiotypic antibodies against pseudorabies vírus antigens. **Vet. Immunol. Immunopathol.,** v. 48, p. 113-122, 1995.

APÊNDICE - Artigo publicado

MAYORGA, O.; MUÑOZ, J. E.; LINCOPAN, N.; TEIXEIRA, A. F.; FERREIRA, L. C.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. The role of adjuvants in therapeutic protection against paracoccidioidomycosis after immunization with the P10 peptide. **Front. Microbiol.,** v. 3, n. 154, p. 1-6, 2012.

frontiers in
MICROBIOLOGY

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE
published: 04 May 2012
doi: 10.3389/fmicb.2012.00154

The role of adjuvants in therapeutic protection against paracoccidioidomycosis after immunization with the P10 peptide

Oriana Mayorga[1], Julian E. Muñoz[1], Nilton Lincopan[1,2], Aline F. Teixeira[1], Luis C. S. Ferreira[1], Luiz R. Travassos[3] and Carlos P. Taborda[1,4]*

[1] *Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute of University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil*

[2] *Department of Clinical Analysis, School of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil*

[3] *Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil*

[4] *Laboratory of Medical Mycology-LIM53/IMTSP, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil*

Edited by:
Joshua D. Nosanchuk, Albert Einstein College of Medicine, USA

Reviewed by:
Joshua D. Nosanchuk, Albert Einstein College of Medicine, USA
Leonardo Nimrichter, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence:
Carlos P. Taborda, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute of University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo, São Paulo 05008-900, Brazil.
e-mail: taborda@usp.br

Paracoccidioidomycosis (PCM), a common chronic mycosis in Latin America, is a granulomatous systemic disease caused by the thermo-dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. The glycoprotein gp43 is the main antigen target of *P. brasiliensis* and a 15-mer internal peptide (QTLIAIHTLAIRYAN), known as P10, defines a major CD4$^+$-specific T cell epitope. Previous results have indicated that, besides having a preventive role in conventional immunizations prior to challenge with the fungus, protective anti-fungal effects can be induced in *P. brasiliensis*-infected mice treated with P10 administered with complete Freund's adjuvant (CFA). The peptide elicits an IFN-γ-dependent Th1 immune response and is the main candidate for effective immunotherapy of patients with PCM, as an adjunctive approach to conventional chemotherapy. In the present study we tested the therapeutic effects of P10 combined with different adjuvants [aluminum hydroxide, CFA, flagellin, and the cationic lipid dioctadecyl-dimethylammonium bromide (DODAB)] in BALB/c mice previously infected with the *P. brasiliensis* Pb18 strain. Significant reductions in the number of colony forming units of the fungus were detected in lungs of mice immunized with P10 associated with the different adjuvants 52 days after infection. Mice treated with DODAB and P10, followed by mice treated with P10 and flagellin, showed the most prominent effects as demonstrated by the lowest numbers of viable yeast cells as well as reductions in granuloma formation and fibrosis. Concomitantly, secretion of IFN-γ and TNF-α, in contrast to interleukin (IL)-4 and IL-10, was enhanced in the lungs of mice immunized with P10 in combination with the tested adjuvants, with the best results observed in mice treated with P10 and DODAB. In conclusion, the present results demonstrate that the co-administration of the synthetic P10 peptide with several adjuvants, particularly DODAB, have significant therapeutic effects in experimental PCM.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, P10, adjuvants, dioctadecyl-dimethylammonium bromide, FliC flagellin, aluminum hydroxide, complete Freund's adjuvant

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis that typically starts as a granulomatous pulmonary disease subsequent to the inhalation of conidia of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. When it is not diagnosed and treated properly, *P. brasiliensis* yeast cells can spread rapidly to lymph nodes, tegument, spleen, liver, and lymphoid organs of the digestive tract (Shikanai-Yasuda et al., 2006). PCM is endemic in Latin America, mostly affecting rural workers in Brazil, Colombia, and Venezuela (Wanke and Londero, 1994), and the majorities are involved in agricultural activities (Blotta et al., 1999; Restrepo et al., 2008). In Brazil, approximately 1,853 (∼51.2%) of 3,583 confirmed deaths due to systemic mycoses from 1996 to 2006 were caused by PCM (Prado et al., 2009).

gp43 is a glycoprotein of 416 amino acids (Puccia et al., 1986; Cisalpino et al., 1996). A specific T-CD4$^+$ cell epitope was mapped to a 15-amino acid sequence designated P10, which is recognized by T cells from mice infected with *P. brasiliensis*. Immunization of previously intratracheally infected BALB/c mice with P10 reduces the fungal load in the lungs more than 200-fold as compared to non-immunized animals (Taborda et al., 1998). P10 immunized animals produced greater amounts of IFN-γ and interleukin (IL)-12. These mice also had significantly reduced damage to lung tissue. In fact, the immune response elicited by P10 prevents the rapid spread of *P. brasiliensis*, and we have hypothesized that P10 administered as with newer adjuvants might enhance the immunoprotection by the peptide. Hence, we have begun to investigate the efficacy of different adjuvants co-administered with

P10. Along this line, we have found FliC flagellin, derived from *Salmonella enterica*, can significantly modify the Th-1 immune response associated with P10 (Braga et al., 2009).

Aluminum hydroxide (Alum) is another adjuvant widely used in human and veterinary vaccines, which is highly effective in eliciting primary immune responses to target antigens. Concerning secondary responses, the adjuvant stimulates a Th-2 immune response that mainly stimulates the production of antibodies. In this sense it is perhaps less suitable for vaccines against intracellular microorganisms (HogenEsch, 2002). Alum has been associated with severe local reactions such as erythema, subcutaneous nodules, and contact hypersensitivity (Baylor et al., 2002).

Promising results have been observed with complete Freund's adjuvant (CFA) and P10 (Marques et al., 2008). However, this adjuvant causes a variety of side effects such as localized injection-site granulomas, hepatic and renal granuloma formation, and necrotizing dermatitis. Therefore, the use of CFA has been limited to experimental immunizations in animal studies. Due to the severity of adverse reactions, this adjuvant has been banned for use in humans as well as for non-experimental veterinary administration (Stills Jr., 2005).

The idea of using cationic lipids (dioctadecyl-dimethylammonium bromide, DODAB) as adjuvants arose from the effective uptake of microparticles by both dendritic cells and macrophages (Lincopan et al., 2009). Cationic polymer particles carry antigen to these phagocytes and can efficiently stimulate antibody production and activate cytotoxic T cells at low antigen dose (Singh et al., 2000; Lincopan et al., 2009). DODAB also induces maturation of dendritic cells (Thiele et al., 2001; Little et al., 2004) with high levels of IL-12 and IFN-γ production, which may be an important benefit in the design of an anti-*Paracoccidioides* vaccine.

In the present work, a comparative appraisal of the various adjuvants is presented aiming to identify which compound produces the most effective immune response to P10 using murine models of PCM.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

Six male BALB/c mice per group (6- to 8-week old) were housed in polypropylene cages under specific pathogen free conditions. Animals used in this study were bred at University of São Paulo animal facility. All experiments involving animals were conducted and approved by the Ethics Committee of University of São Paulo and conducted in accordance with international recommendations.

FUNGAL STRAIN

Virulent *P. brasiliensis* Pb18 yeast cells were used to infect the animals. The strain was maintained by weekly passage on solid Sabouraud medium at 37°C and yeast cells were used after 7–10 days of growth. Before the experimental infection, the fungus was grown in modified McVeigh–Morton medium at 37°C for 5–7 days (Restrepo and Arango, 1980). Fungal cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and counted in a hemocytometer. The viability of fungal suspensions was determined by staining with trypan blue (Sigma, St. Louis, MO, USA) and was always higher than 90%. The virulence of the Pb18 strain was checked in each experiment by infecting BALB/c mice i.t. and recovering the yeast cells from the infected organs.

INTRATRACHEAL INFECTION OF BALB/c MICE

BALB/c mice were inoculated i.t. with 3×10^5 virulent Pb18 yeast cells/animal, grown on Sabouraud agar and suspended in sterile saline (0.85% NaCl). A maximum volume of 50 μl was inoculated per mouse. Briefly, mice were anesthetized i.p. with 200 μl of a solution containing 80 mg/kg ketamine and 10 mg/kg of xylazine (both from União Química Farmacêutica, Brazil). After approximately 5 min, their necks were hyperextended, and the tracheas were exposed at the level of the thyroid and injected with 3×10^5 yeast cells.

PEPTIDE SYNTHESIS AND PURIFICATION

Peptide synthesis and purification was carried out at the Department of Biophysics, UNIFESP as described previously (Taborda et al., 1998). HPLC analysis showed that the synthetic P10 in the amidated form was >90% pure.

IMMUNIZATION OF MICE

Immunization of BALB/c mice (6- to 8-week old males) was initiated 30 days after infection and repeated on days 37 and 44, by the subcutaneous route, with 20 μg of P10 in presence of the respective adjuvant. The adjuvants used were CFA with subsequent immunizations with incomplete Freund's adjuvant (IFA); Alum 100 μg/ml; FliC flagellin 5 μg/animal, and cationic lipid at 0.1 mM/animal. All adjuvants were vortexed with the peptide before immunization. The animals were sacrificed 7 days after the last immunization, at day 52 of infection.

COLONY FORMING UNITS

For each mouse, the lungs, spleen, and liver were excised and weighed immediately after sacrifice. Tissues were individually homogenized in PBS and 100 μl of this suspension was plated on brain heart infusion medium (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), supplemented with 4% fetal bovine serum (Gibco, NY, USA) and 5% of the spent culture medium of *P. brasiliensis* 192 isolate (Castañeda et al., 1988), streptomycin/penicillin 10 IU/ml (Cultilab, Brazil), and cycloheximide 500 μg/ml (Sigma, St Louis, MO, USA). The plates were incubated at 37°C for a period of 10 days. The numbers of colonies were counted and results expressed in colony forming unit (CFU) per gram of tissue.

CYTOKINE ANALYSIS

Lungs of each mouse were macerated with protease inhibitor (Sigma, St Louis, MO, USA) and centrifuged; supernatants of these samples were used for cytokine detection. IL-4, IL-10, TNF-α, and IFN-γ were measured using ELISA kits (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). The detection limits of the assays were as follows: 7.8 pg/ml for IL-4, 31.25 pg/ml for IL-10 and IFN-γ, and 15.6 pg/ml for TNF-α, as previously determined by the manufacturer. Cytokine levels present in the supernatant preparations were analyzed using GraphPad Prism 5.

HISTOPATHOLOGY

The lungs were excised, fixed in 10% buffered formalin (Merck, Germany) and submitted to histopathological analysis [(hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome].

STATISTICAL ANALYSIS

Statistics was done using GraphPad Prism 5 software (San Diego, CA, USA). The results were expressed as mean values and standard deviations (SDs) of the indicated values. The non-parametric Tukey's honestly significant difference test was employed. *p*-Values of ≤ 0.05 indicated statistical significance.

RESULTS

COLONY FORMING UNITS IN INFECTED BALB/c MICE IMMUNIZED WITH PEPTIDE 10 (P10)

After 30 days of infection, immunizations were initiated with three weekly doses of P10 with or without the different adjuvants. After 52 days of infection, the fungal load was evaluated by enumeration of CFUs from recovered organs (lung, spleen, and liver). Lungs of mice immunized with P10 along with each of the different adjuvants had a significantly reduced number of CFU compared to controls (**Figure 1**). The order of efficacy for CFU reduction was cationic lipid and P10 >> CFA/IFA > Alum > FliC. In this model, we did not recover any fungal cells from the spleens or livers of mice that received any of the immunizations with P10 (data not shown), demonstrating the effectiveness of the peptide in the control of experimental PCM. In contrast, the fungal burdens were 625 ± 60 CFU/g of tissue in the spleens and 296 ± 59 CFU/g of tissue in the livers of unimmunized mice.

CYTOKINE PATTERN INDUCED BY IMMUNIZATION WITH P10 ASSOCIATED WITH ADJUVANTS

In comparison with control infected animals, IFN-γ was significantly increased in mice that received P10 with either cationic lipid or FliC (**Figure 2A**). TNF-α levels were significantly increased only in mice treated with P10 and cationic lipid (**Figure 2B**). P10 immunization with either cationic lipid or FliC significantly reduced levels of IL-4 (**Figure 2C**) and IL-10 (**Figure 2D**). Immunization with P10 and Alum also reduced IL-10 levels, but did not significantly alter the levels of the other cytokines analyzed.

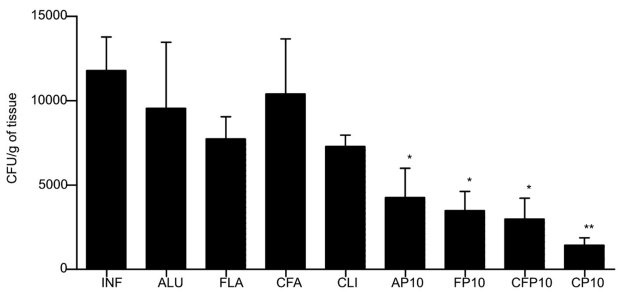


FIGURE 1 | Colony forming units (CFU) from lungs of BALB/c mice infected intratracheally with 3 × 10^5 yeast cells of Pb18 and immunized at 30, 37, and 44 days after infection with the different adjuvants with or without P10. Animals were sacrificed after 60 days of infection. Control animals were infected by not immunized (IFN). The adjuvants used were: aluminum hydroxide alone (ALU) or with P10 (AP10), FliC flagellin alone (FLA) or with P10 (FP10), complete Freund's adjuvant alone (CFA) or with P10 (CF10), and cationic lipid alone (CLI) or with P10 (CP10). Significant difference $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

LUNG HISTOPATHOLOGY IN BALB/c MICE INFECTED (i.t.) WITH Pb18 AND IMMUNIZED WITH P10

Lung tissues from mice immunized with cationic lipid with or without P10 were stained with H&E and compared with unimmunized infected tissues as well as uninfected lungs (**Figure 3**). As expected, the non-infected group (**Figure 3A**) showed normal lung tissue, and the unimmunized infected lungs (**Figure 3B**) showed dense cell infiltrates with high numbers of fungal cells disseminated throughout the lung parenchyma. In the case of mice immunized only with the cationic lipid, we observed the formation of loose granulomas with many fungal cells (**Figure 3C**). In contrast, lungs of mice immunized with cationic lipid and P10 showed significantly preserved lung parenchyma without fungal cells (**Figure 3D**). The histological appearances of lungs from mice immunized with either FliC (**Figure 3E**) or Alum (**Figure 3G**) alone were similar to that with cationic lipid alone (**Figure 3C**). Immunization of mice with P10 and FliC resulted in improved granuloma formation in the lungs, which prevents the spread of the fungus, and increased preservation of normal lung parenchyma (**Figure 3F**). Although there was a slight increase in normal lung parenchyma in mice immunized with P10 and Alum, there was poor granuloma formation and large numbers of yeast cells within areas of inflammation (**Figure 3H**).

The amount of pulmonary collagen type I in mice immunized with P10 and FliC, Alum, or cationic lipid were compared with unimmunized infected controls using Masson's trichrome staining. Tissues from control mice revealed abundant collagen I fibers within cellular infiltrates containing large numbers of fungal cells (**Figure 4A**). Although no fungal cells were visualized, lungs of mice immunized with FliC flagellin and P10 nevertheless diffusely displayed increased amounts of collagen (**Figure 4B**). Mice immunized with Alum and P10 showed large granulomas containing fungal cells and the formation of collagen fibers on the granuloma's periphery (**Figure 4C**). In contrast, mice immunized with cationic lipid and P10 displayed preserved lung tissue without increased collagen (**Figure 4D**).

DISCUSSION

The P10 peptide (QTLIAIHTLAIRYAN) has important immunoprotective properties that make it a leading candidate for the development of a therapeutic vaccine (Taborda et al., 1998). We have also shown that P10 immunization can be utilized concomitantly with standard antifungal drugs in the treatment of PCM and that co-administration may also prevent disease recurrence (Marques et al., 2008).

The protective effect of P10 is related to the induction of an INF-γ dependent Th-1 immune response (Taborda et al., 1998; Travassos et al., 2007), so it may be stimulated by adjuvants or nanoparticle encapsulation that increase the efficiency of P10 uptake by dendritic cells resulting in the enhanced presentation of the peptide for cellular immune responses (Amaral et al., 2010; Magalhães et al., 2012). In the present work, we show that the association of P10 with cationic lipids led to a significant reduction of

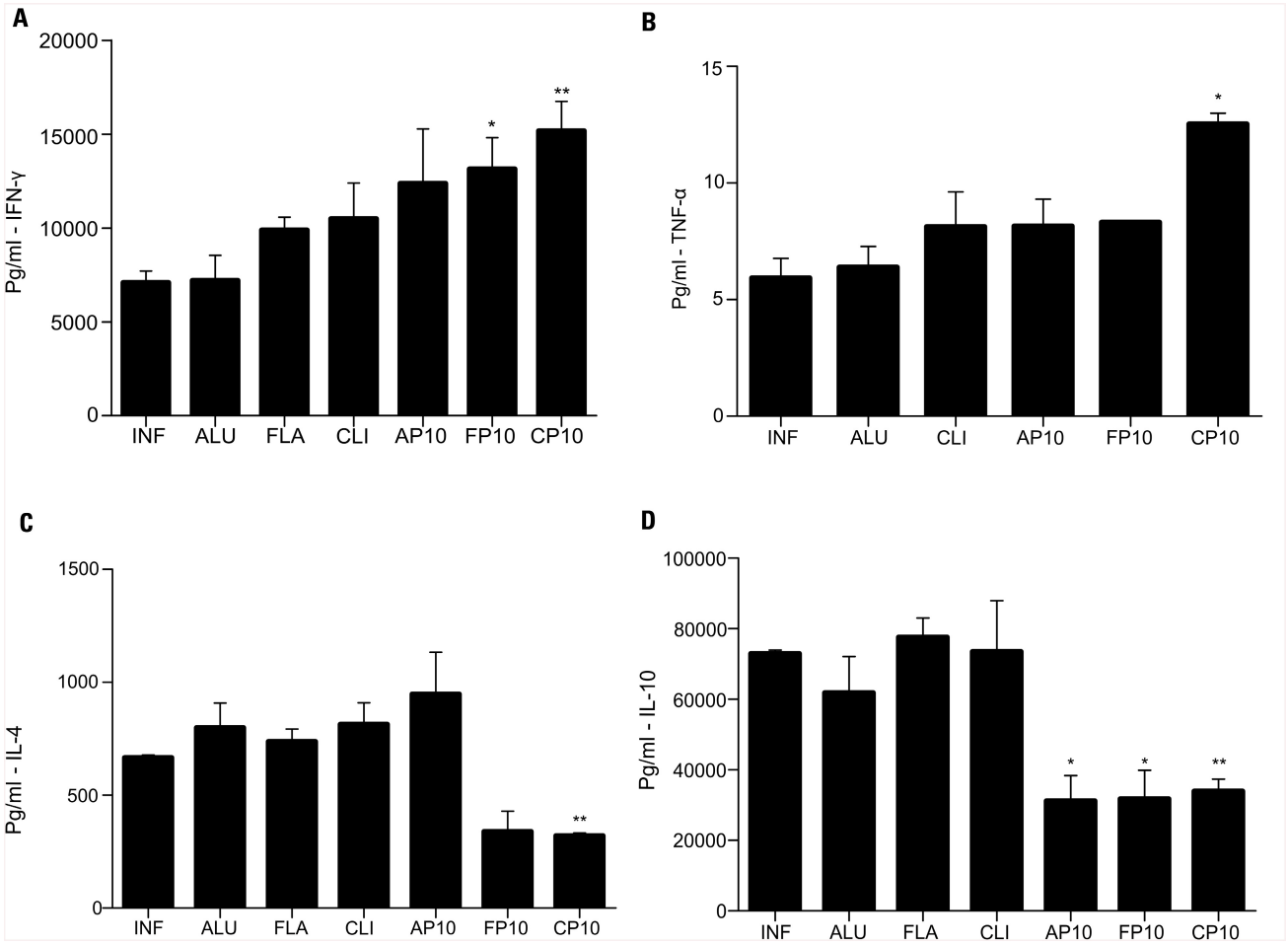


FIGURE 2 | Cytokine detection was assayed in the lung tissue from BALB/c mice 52 days after infection. Analyzed cytokines were: **(A)** IFN-γ, **(B)** TNF-α, **(C)** IL-4, and **(D)** IL-10. Each group was infected i.t. with 3×10^5 yeast cells and immunized at 30, 37, and 44 days after infection with different adjutants with or without P10. The groups of mice included unimmunized, infected control mice (INF); animals infected and immunized with aluminum hydroxide alone (ALU) or with P10 (AP10), FliC flagellin alone (FLA) or with P10 (FP10), and cationic lipid alone (CLI) or with P10 (CP10). $*p < 0.05$: significance $p < 0.05$ compared to control mice (only infected). $**p < 0.01$: compared to control mice (only infected).

CFU in the lungs of 52-day infected animals (**Figure 1**). In contrast, animals immunized only with P10 (without adjuvants), had minimal reductions in fungal burden (not shown data). Hence, combining adjuvants, such as cationic lipids, with P10 can generate augmented immune responses mediated by Th-1 cells, directly related to the secretion of IFN-γ (**Figure 2A**), which leads to peritoneal and lung macrophage activation as well as enhancing their fungicidal effect on yeasts and conidia of *P. brasiliensis* (Buissa-Filho et al., 2008). Immunization performed with P10 associated with antifungal drugs in animals infected with Pb18, has been shown to induce a significant reduction in IL-4 (Marques et al., 2008), which we now show also occurs in the setting of immunizations with cationic lipid and P10 (**Figure 2C**). Moreover, P10 administration with cationic lipid also significantly reduces levels of IL-10 (**Figure 2D**). It is worth noting, however, that depending on the degree of inflammation generated by the Th-1 response, Th-2 cytokines are essential for balancing the immune response and reducing the risk of self-damage (Travassos et al., 2008).

Studies with cationic lipids associated with recombinant HSP of *Mycobacterium leprae* have demonstrated the ability of the adjuvant to promote antigen presentation in lymph node cells with production of high levels of IL-12 and INF-γ, suggesting that cationic lipid can be useful in the formulation of vaccines against intracellular bacteria, as well as against protozoa (Lincopan et al., 2009). IFN-γ is required for the synthesis of TNF-α by macrophages and is essential for the accumulation of these cells and their subsequent differentiation into epithelioid cells. INF-γ is also responsible for granuloma's formation and maintenance, and, therefore, it plays a vital role in the control of dissemination by fungi such as *P. brasiliensis* (Souto et al., 2000).

Although the cationic lipid/P10 association has demonstrated the best protective response in the setting of short-term infection in our murine model, it is relevant also to consider the protective effect of the association of P10 and FliC flagellin. A significant reduction in the number of CFU was observed and the cytokine profile was similar to that achieved with cationic lipid and P10

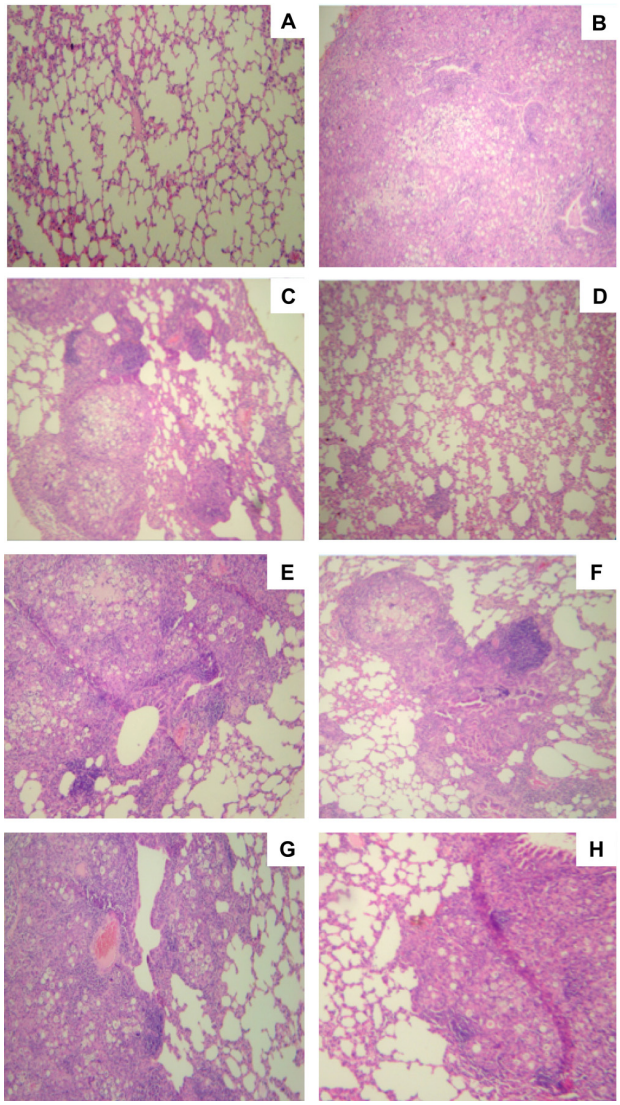


FIGURE 3 | Histological sections of murine lungs from i.t. infected BALB/c mice submitted to immunization with P10 associated to cationic lipid. Groups of mice included **(A)** uninfected controls, **(B)** unimmunized infected controls, **(C)** infected and immunized only with the cationic lipid, **(D)** infected and immunized with cationic lipid plus P10, **(E)** infected and immunized only with FliC flagellin, **(F)** infected and immunized with FliC flagellin plus P10, **(G)** infected and immunized only with aluminum hydroxide, **(H)** infected and immunized with aluminum hydroxide plus P10 after 52 days of infection. H&E staining, ×10 magnification.

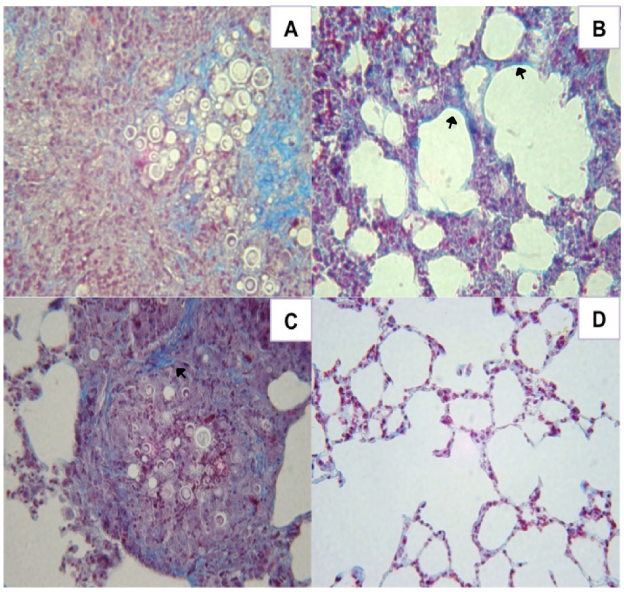


FIGURE 4 | Histological sections of murine lungs from i.t. infected BALB/c mice immunized after 30 days of infection with P10 associated with FliC flagellin, aluminum hydroxide, or cationic lipid. (A) infected, unimmunized control mice, **(B)** infected and immunized with FliC flagellin plus P10, **(C)** infected and immunized with aluminum hydroxide plus P10, and **(D)** infected and immunized with cationic lipid plus P10 after 52 days of infection. Masson's trichrome staining, ×40 magnification. Blue staining and arrows indicate type I collagen fibers.

(**Figures 1 and 2**). We have previously shown that prophylactic experiments performed with FliC flagellin have demonstrated the effectiveness of the association of this adjuvant with P10 allowing for the control of fungal infection in vaccinated mice (Braga et al., 2009). Intranasal immunization carried out with this formulation induced high levels of IFN-γ and IL-12 production by lung cells and suppressed the production of Th-2 cytokines. The formation of compact granulomas (**Figure 3F**) as well as cytokine levels obtained with FliC Flagellin and P10, can be associated to the administration route, since present immunizations were performed subcutaneously, according to Braga et al. (2009), better results are obtained with intranasal immunizations.

In the lung parenchyma, *P. brasiliensis* induces chronic damage leading to the development of pulmonary fibrosis, which is presumably due to persistent antigenic stimulation and an ongoing active immune response. Granulomatous inflammation can increase the formation of connective tissue rich in collagen type I and III, leading to functional changes and subsequent fibrosis in the lung (Naranjo et al., 2010). Since fibrosis is a well-known sequela of PCM, it is therefore important that the adjuvants used do not induce an exacerbated inflammatory response. In fact, the association of cationic lipid and P10 resulted in a significant reduction of pulmonary fibrosis in mice infected with Pb18 (**Figure 4D**).

In summary, we have shown that the examined regimens combining P10 with different adjuvants results in significantly different protective responses. Administration of P10 with cationic lipid provided the most effective response profile, with the greatest reduction in fungal burden and a Th-1 biased cytokine response that maintained pulmonary architecture without inducing fibrotic injury.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from FAPESP 11/17267-4, 09/15823-7, 09/53354-9, 07/58750-4 and CNPq 146809/2010-6. Carlos P. Taborda, Luiz R. Travassos, Luis C. S. Ferreira, and Nilton Lincopan are research fellows of the CNPq. We acknowledge the valuable scientific inputs from Dr. Joshua D. Nosanchuk.

REFERENCES

Amaral, A. C., Marques, A. F., Muñoz, J. E., Bocca, A. L., Simioni, A. R., Tedesco, A. C., Morais, P. C., Travassos, L. R., Taborda, C. P., and Felipe, M. S. (2010). Poly(lactic acid-glycolic acid) nanoparticles markedly improve immunological protection provided by peptide P10 against murine paracoccidioidomycosis. *Br. J. Pharmacol.* 159, 1126–1132.

Baylor, N. M., Egan, W., and Richman, P. (2002). Aluminum salts in vaccines – US perspective. *Vaccine* 20, 18–23.

Blotta, M. H., Mamoni, R. L., Oliveira, S. J., Nouer, S. A., Papaiordanou, P. M., Goveia, A., and Camargo, Z. P. (1999). Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 390–394.

Braga, C., Rittner, G., Muñoz, J., Teixeira, A., Massis, L., Sbrogio-Almeida, M., Taborda, C., Travassos, L., and Ferreira, L. (2009). *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FliC flagellin. *Infect. Immun.* 77, 1700–1707.

Buissa-Filho, R., Puccia, R., Marques, A. F., Pinto, F. A., Muñoz, J. E., Nosanchuk, J. D., Travassos, L. R., and Taborda, C. P. (2008). 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.* 76, 3321–3328.

Castañeda, E., Brummer, E., Perlman, A. M., Mc-Ewen, J. G., and Stevens, D. A. (1988). A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. *J. Med. Vet. Mycol.* 26, 351–358.

Cisalpino, P. S., Puccia, R., Yamauchi, L. M., Cano, M. I., da Silveira, J. F., and Travassos, L. R. (1996). Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis. J. Biol. Chem.* 271, 4553–4560.

HogenEsch, H. (2002). Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine* 20, 34–39.

Lincopan, N., Espíndola, N., Vaz, A. B., Da Costa, M., Faquim-mauro, E., and Carmona-Ribeiro, A. (2009). Novel immunoadjuvants based on cationic lipid: preparation, characterization and activity in vivo. *Vaccine* 27, 5760–5771.

Little, S. R., Lynn, D. M., Ge, Q., Anderson, D. G., Puram, S. V., Chen, J., Eisen, H. N., and Langer, R. (2004). Poly-β amino ester-containing microparticles enhance the activity of nonviral genetic vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9534–9539.

Magalhães, A., Ferreira, K. S., Almeida, S. R., Nosanchuk, J. D., Travassos, L. R., and Taborda, C. P. (2012). Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis. Clin. Vaccine Immunol.* 19, 23–29.

Marques, A. F., Da Silva, M. B., Juliano, M. A. P., Travassos, L. R., and Taborda, C. P. (2008). Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis. Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2814–2819.

Naranjo, T. W., Lopera, D. E., Diaz-Granados, L., Duque, J. J., Restrepo, A., and Cano, L. E. (2010). Combined itraconazole-pentoxifylline treatment promptly reduces lung fibrosis induced by chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 24, 81–91.

Prado, M., Silva, M. B., Laurenti, R., Travassos, L. R., and Taborda, C. P. (2009). 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* 104, 513–521.

Puccia, R., Schenkman, S., Gorin, P. A. J., and Travassos, L. R. (1986). Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect. Immun.* 53, 193–203.

Restrepo, A., and Arango, M. D. (1980). In vitro susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to sulfonamides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18, 190–194.

Restrepo, A., Bernard, G., De Castro, C., Agudelo, C., and Tobón, A. (2008). Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 29, 182–197.

Shikanai-Yasuda, M. A., Telles, F. F., Mendes, R. P., Colombo, A. L., and Moretti, M. L. (2006). Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39, 297–310.

Singh, M., Briones, M., Ott, G., and O'Hagan, D. (2000). Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 811–816.

Souto, J. T., Figueiredo, F., Furlanetto, A., Pfeffer, K., Rossi, M. A., and Silva, J. S. (2000). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.* 156, 1811–1820.

Stills, H. F. Jr. (2005). Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J.* 46, 280–293.

Taborda, C. P., Juliano, M. A., Puccia, R., Franco, M., and Travassos, L. R. (1998). Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/C mice. *Infect. Immun.* 66, 786–793.

Thiele, L., Rothen-Rutishauser, B., Jilek, S., Wunderli-Allenspach, H., Merkle, H. P., and Walter, E. (2001). Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J. Control. Release* 76, 59–71.

Travassos, L. R., Goldman, G., Taborda, C. P., and Puccia, R. (2007). "Insights in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenicity," in *New Insights in Medical Mycology*, ed. K. Kavanagh (Dordrecht: Springer), 241–265.

Travassos, L. R., Taborda, C. P., and Colombo, A. L. (2008). Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 6, 251–262.

Wanke, B., and Londero, A. T. (1994). "Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection," in *Paracoccidioidomycosis*, eds M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno, and G. del Negro (Boca Raton: CRC Press), 109–120.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 02 April 2012; accepted: 03 April 2012; published online: 04 May 2012.

Citation: Mayorga O, Muñoz JE, Lincopan N, Teixeira AF, Ferreira LCS, Travassos LR and Taborda CP (2012) The role of adjuvants in therapeutic protection against paracoccidioidomycosis after immunization with the P10 peptide. Front. Microbio. ***3****:154. doi: 10.3389/fmicb.2012.00154*

This article was submitted to Frontiers in Fungi and Their Interactions, a specialty of Frontiers in Microbiology.

Copyright © 2012 Mayorga, Muñoz, Lincopan, Teixeira, Ferreira, Travassos and Taborda. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited.