Leandro Buffoni Roque da Silva

**Caracterização da atividade moduladora de células dendríticas
diferenciadas a partir de monócitos de camundongos infectados com
isolado virulento de *Paracoccidioides* spp. pulsadas com o peptídeo
P10 no tratamento da paracoccidioidomicose**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

**São Paulo
2018**

Leandro Buffoni Roque da Silva

**Caracterização da atividade moduladora de células dendríticas
diferenciadas a partir de monócitos de camundongos infectados com
isolado virulento de *Paracoccidioides* spp. pulsadas com o peptídeo
P10 no tratamento da paracoccidioidomicose**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

Versão Corrigida Conforme Resolução CoPGr6018/11

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Leandro Buffoni Roque da
Caracterização da atividade moduladora de células
dendríticas diferenciadas a partir de monócitos de
camundongos infectados com isolado virulentos de
Paracoccidioides spp. pulsadas com o peptídeo P10 no
tratamento da paracoccidioidomicose / Leandro
Buffoni Roque da Silva. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: Carlos Pelleschi Taborda.

Descritores: 1.Paracoccidioidomicose 2.Células
dendríticas 3.Peptídeo P10 4.Vacina
5.Paracoccidioides brasiliensis 6.Resposta imune
celular 7.Imunidade inata

USP/FM/DBD-412/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 08/12/2014, **APROVOU “Ad Referendum”** o Protocolo de Pesquisa nº **189/14** intitulado: **“Caracterização da atividade moduladora de células dendríticas isoladas a partir de camundongos infectados com isolados virulentos de Paracoccidioides spp. na presença ou ausência de drogas antifúngicas”** que utilizará **400** animais da espécie **camundongo**, apresentado pelo **Departamento de Dermatologia**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Carlos Pelleschi Taborda

Pesquisador (a) Executante: Leandro Buffoni Roque da Silva

CEUA-FMUSP, 08 de Dezembro de 2014

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 09.02.18 **APROVOU o documento** abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **189/14** intitulado “**Caracterização da atividade de moduladora de células dendríticas isoladas a partir de camundongos infectados com isolados virulentos de Paracoccidioides spp. na presença ou ausência de drogas antifúngicas**” apresentado pelo Departamento Dermatologia.

- Acréscimo de **200** camundongos Balb/c machos de 6-8 semanas

Pesquisador Responsável: **Carlos Pelleschi Taborda**

CEUA-FMUSP, 09 de Fevereiro de 2018

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Aos meus pais e familiares, que me apoiaram no dia a dia e sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Meus pais, André Roque da Silva e Maria Letícia Buffoni Roque, que me apoiam desde sempre, principalmente quando resolvi sair de casa há 11 anos para correr atrás de meus sonhos. Eles são meu alicerce e sei que sempre estarão cuidando de mim onde quer que eu esteja. A minha irmã Alícia Buffoni Roque da Silva, amiga e companheira. Uma pessoa que a cada dia consegue me surpreender, com tanto carinho e força, me apoiando e algumas vezes me acompanhando nas escolhas e caminhos que resolvo seguir.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Carlos Pelleschi Taborda, que é um exemplo de dedicação e de excelência em pesquisa e que ao longo desses anos se tornou um amigo. Agradeço de coração a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pelos ensinamentos e incentivos diários.

Aos Professores (as), Luis Carlos Ferreira, Gil Bernard, Sandro Rogério de Almeida, Silvia Beatriz Boscardin, Gilda Del Negro, Leila Bezerra, pelas colaborações bem como a todos os professores do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo.

A todos os colegas e amigos que passaram pelo laboratório e deixaram muita saudade e vários ensinamentos, Márcia Pinto da Silva, Felipe Augusto, Oriana M. Nader, Diego Rossi, Glaucé M. G. Rittner, Adriana Menezes, Fernanda Dias, Renata Amélia, Thor A. Sessa, Adriana Magalhães, Paula Barbarian, Vinicius D. Luft.

A todos colegas e amigos que trabalham nos laboratórios (Fungos Dimórficos Patogênicos ICB-II e Laboratório de Micologia LIM-53 IMT-FMUSP) e aos novos que chegaram, Gloria Souza, Mônica, Aline Santana, Rafael, Lumena Siqueira, Viviane Gimenes, Vivian Coelho, Danilo Thomaz, Luciana Thomaz, Marcelo Valdemir, Samuel Rodrigues, Camila Boniche, Agata Nogueira, Suelen Rossi, Dra. Renata Buchieri, Zita Gregório.

A todos colegas de outros laboratórios do Instituto de Ciências Biomédicas – II e IV os quais ajudaram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, Robert, Roberta, Lenon, Carla, Bruna, Ismael, Tatiana, Marinna, Ednei.

A meu amigo Rodrigo Oliveira, não tenho palavras para agradecer a amizade e companheirismo. Pessoa que por onde passa só deixa coisa boa e faz com que todos gostem dele. Meu amigo que mesmo morando no México desta vez, sempre vai estar perto.

Ao meu amigo, Julian Esteban Muñoz, primeiro amigo que fiz nessa nova empreitada em São Paulo, não tem como quantificar ou mensurar o quanto você me ajudou, ensinou e ainda mesmo tendo voltado para Colômbia continua ajudando e ensinando.

Ao meu irmão baiano Lucas dos Santos Dias (PIRI), por ter esse coração enorme e sempre ter paciência de me ensinar e ajudar nos experimentos. Sei que agora ele se encontra bem longe fisicamente, dando continuidade ao seu processo de aprendizagem. E também com certeza passando seus conhecimentos (que convenhamos são bem vastos e amplos) para outras pessoas. Mas ele pode ter certeza que está muito próximo no coração e nas lembranças.

Ao Cleison L. Taira (Creison) que além de colega de trabalho se tornou um grande amigo, não tem como agradecer toda ajuda nos experimentos, sacrifícios, marcações de citometria e por aí vai indo, tenho que agradecer também aos conselhos, alguns muito bons outros com certeza muito duvidosos, mas que sempre eram dados em meio a várias risadas e muita sinceridade, algumas vezes sinceridade até demais (hahaha).

A Shirlei A. Vieira Marques, por se tornar uma amiga e cuidar de mim como um filho, sempre te levarei no coração.

A Martha Urán (Judite), por me suportar 3 anos trabalhando e morando juntos, tivemos nossas brigas, desentendimentos, mas também tivemos momentos de PAZ, ainda agradeço muito por todos conselhos e ensinamentos que você deixou.

Ao técnico do biotério Marco André Alves pelo cuidado dos animais durante todos esses anos de pesquisa e também pelas risadas. Uma pessoa realmente diferenciada de coração enorme a qual tive o prazer de conhecer e tornar amigo.

A minha avó, Salvina Clara Buffoni, pelo carinho e mais carinho que ela me dá sempre, por todos ensinamentos que me passou e passa até hoje.

Em memória ao meu avô, José Roque, que me acompanhou até obter o título de Mestre. É muito triste ele não estar aqui fisicamente, mas sei que ele está me acompanhando sempre, e

tenho certeza que está cuidando de mim e me direcionando em todas as conquistas agora junto com meus outros avós Aparecida Roque e Humberto Buffoni, os quais sempre vou lembrar com muito carinho.

Ao casal de amigos Lucas Buled e Tamara Buled, amigos a muitos e muitos anos, não tenho palavras para explicar a importância de vocês nessa caminhada e principalmente nessa reta final, onde vocês sempre estavam por perto me apoiando e me incentivando.

Aos funcionários da secretaria, Ruth Eugênia e Marcelo Alves, por sempre estarem a disposição para me ajudar, muito obrigado.

Aos meus Tios Manoel e Neide, e meu primo Marcos Roberto, por terem me acolhido quando cheguei em São Paulo, e por sempre me receberem com muito carinho, obrigado de coração.

E finalmente, a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Peço desculpas, por não ter descrito meus sinceros agradecimentos pessoa por pessoa que contribuíram comigo durante estes 4 anos, pois se fosse assim fazer eu escreveria outra tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

E também com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Obrigado por tudo!

“Eu procuro lembrar a mim mesmo, umas cem vezes por dia, que minha vida privada e profissional depende do trabalho de outras pessoas, vivas e mortas, e que preciso me superar a cada dia para dar aos outros algo próximo do que eu recebi e recebo.”

Albert Einstein

“Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre.”

Charles Chaplin

“Não é o mais forte que sobrevive. Nem o mais inteligente. Mas o que melhor se adapta as mudanças.”

Charles Darwin

Lista de abreviações e siglas

Abs	Absorbância
Ac	Anticorpo
A/J	Linhagem de camundongo
APC	<i>Antigen-presenting Cell</i> - Células apresentadoras de antígenos
B220	Marcador de superfície celular
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (infusão de cérebro e coração)
BMDC	<i>bone marrow - derived dendritic cells</i> - Células dendríticas derivadas de células de medula óssea
°C	Graus Celsius
CD4	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupamento de diferenciação 4
CD8a	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupamento de diferenciação 8a
CD8	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupamento de diferenciação 8
CD11b	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupamento de diferenciação 11b
CD11c	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupamento de diferenciação 11c
CD34	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupamento de diferenciação 34
CD40	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupamento de diferenciação 40
CD80	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupamento de diferenciação 80
CD86	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupamento de diferenciação 86
CD123	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupamento de diferenciação 123
CD303	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupamento de diferenciação 303

CD304	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupamento de diferenciação 304
CO ₂	Dióxido de carbono
DCs	<i>Dendritic cells</i> - Células Dendríticas
Fc	Fragmento cristalizável da molécula de imunoglobulina
FITIC	Isotiocianato de Fluoresceína
FLT3	Fator estimulador de colônia de macrófagos
FSc	Tamanho relativo
g	Relative centrifuge force
gp43	Glicoproteína de 43 kDa de <i>P. brasiliensis</i>
GM-CSF	Fator de Crescimento Celular de Monócitos e Granulócitos
H ₂ O	Água
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgG1	Imunoglobulina G isótipo 1
IgG3	Imunoglobulina G isótipo 3
IgG2a	Imunoglobulina G isótipo 2a
IgG2b	Imunoglobulina G isótipo 2b
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12

i.t.	Intratraqueal
kDa	Quilodalton
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio
L-DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina
M	Molar
mM	Mili Molar
mø	Macrófago
mg	Miligramas
mL	Mililitros
min	Minutos
MHC-II histocompatibilidade-II	Major Histocompatibility Complex II - Complexo principal de
MMcM	Meio de cultura líquido definido por McVeigh & Morton
MoDC	Células dendríticas derivadas de monócitos
µl	Microlitros
µg	Microgramas
µm	Micrometros
NF-KB	Nuclear Factor-Kappa B
NK	Natural killer
nm	nanômetro
PAMPs associados a patógenos	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> - Padrões moleculares

P10	Peptídeo 10
Pb	<i>Pacoccidioides brasiliensis</i>
Pb 18	<i>Pacoccidioides brasiliensis</i> isolado 18
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Tampão fosfato salina
PCM	Paracoccidioidomicose
pDC	Células Pré-dendríticas
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pl	<i>Paracoccidioides lutzii</i>
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
PS2	Espécie críptica de <i>Paracoccidioides</i>
PS3	Espécie críptica de <i>Paracoccidioides</i>
PS4	Espécie críptica de <i>Paracoccidioides</i>
rpm	Rotações por minuto
S1	Espécie críptica de <i>Paracoccidioides</i>
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i> – Livres de germes patogênicos
específicos	
SZM-TMP	sulfametoxazol-trimetoprim
TCD4+	Linfócito T CD4 positivo
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2

Th17	Linfócito T <i>helper</i> 17
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
Treg	Células T Reguladoras
UFC	Unidade formadora de colônia
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana

Resumo

Silva LBR. Caracterização da atividade moduladora de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos de camundongos infectados com isolado virulento de *Paracoccidioides* spp. pulsadas com o peptídeo P10 no tratamento da Paracoccidioidomicose [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018

Paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica prevalente na América Latina, é uma doença granulomatosa causada pelo fungo termodimórfico do gênero *Paracoccidioides* spp. O maior número de casos dessa doença tem sido reportado no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina. A existência de extensas áreas endêmicas, alto potencial incapacitante devido a fibroses pulmonares, grande quantidade de mortes prematuras, faz com que a PCM seja considerada um grave problema de Saúde Pública. Apesar do tratamento medicamentoso ser relativamente eficiente, o tempo longo de uso das drogas e os efeitos colaterais provocados podem levar a diminuição da adesão ao tratamento diminuindo assim eficácia. O uso de vacinas terapêuticas pode ser uma importante ferramenta no controle da PCM. Uma das modalidades investigadas pelo nosso grupo é a utilização de células dendríticas (DCs) pulsadas com o peptídeo P10 como vacina terapêutica no controle da PCM. Resultados apresentados por nosso grupo, demonstraram que DCs diferenciadas a partir de células de medula óssea de camundongos saudáveis pulsadas com o peptídeo 10 (P10) podem ser utilizadas como adjuvante no tratamento da paracoccidioidomicose experimental em camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos. Assim sendo, nossa proposta no presente trabalho foi avaliar se DCs diferenciadas de células de medula óssea (BMDCs) ou de monócitos circulantes (MoDCs) de camundongos (BALB/c) infectados apresentam modulação prévia devido à exposição a antígenos fúngicos, avaliamos *in vitro* a capacidade das células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos circulantes de camundongos infectados com Pb18 estimular proliferação de linfócitos CD8⁺ e CD4⁺, analisamos a capacidade de células dendríticas derivadas de monócitos circulantes de camundongos infectados com Pb18 pulsadas com P10 em induzir uma resposta protetora. Nossos resultados obtidos são promissores e reforçam dados já publicados pelo grupo os quais

demonstraram a eficiência do peptídeo P10 no tratamento da paracoccidiodomicose experimental; apontam que o P10 é capaz de modular ativamente células dendríticas diferenciadas de monócitos circulantes e diferenciadas de células de medula óssea; demonstram que BMDCs e MoDCs pulsadas ou não com P10 tem a capacidade de estimular proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺; confirmaram que BMDC e MoDCs pulsadas ou não com P10 diminuem a carga fúngica no tecido pulmonar, estimulando um padrão de citocinas misto, porém com predominância de citocinas pró-inflamatórias que incitam resposta imune celular do tipo Th1, que é protetora na PCM. Estes dados foram respaldados com a análise dos cortes histológicos onde os pulmões dos camundongos tratados com BMDCs ou MoDCs pulsadas com P10 apresentaram parênquima pulmonar mais conservado em comparação com os pulmões dos grupos que não receberam tratamento com BMDCs ou MoDCs, com diminuição significativa de células fúngicas viáveis.

Descritores: paracoccidiodomicose, células dendríticas, peptídeo P10, vacina, *Paracoccidioides brasiliensis*, camundongos, citocinas.

ABSTRACT

Silva LBR. Characterization of the modulating activity of differentiated dendritic cell from monocytes isolated from mice infected with virulent isolates of *Paracoccidioides* spp. pulsed with the peptide P10 in the treatment of Paracoccidioidomycosis [thesis]. São Paulo: "Faculdade de medicina , Universidade de São Paulo"; 2018

Paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis prevalent in Latin America, is a granulomatous disease caused by the thermodynamically morphic fungus of the genus *Paracoccidioides* spp. The highest number of cases of this disease has been reported in Brazil, Colombia, Venezuela and Argentina. The existence of extensive endemic areas, a high incapacitating potential due to pulmonary fibroses, and a large number of premature deaths, makes the PCM considered a serious public health problem. Although the drug treatment is relatively efficient, the long time of use of the drugs and the side effects provoked can lead to the decrease of the adherence to the treatment thus diminishing their effectiveness. The use of therapeutic vaccines can be an important tool in the control of PCM. One of the modalities investigated by our group is the use of dendritic cells (DCs) pulsed with the peptide P10 as therapeutic vaccine in the control of PCM. Results presented by our group demonstrated that DCs differentiated from bone marrow cells of healthy mice pulsed with peptide 10 (P10) can be used as an adjuvant in the treatment of experimental paracoccidioidomycosis in immunocompetent and immunosuppressed mice. Thus, our proposal in the present study evaluated the capacity of differentiated DCs of bone marrow cells (BMDCs) or circulating monocytes (MoDCs) of infected mice (BALB/c) exhibited previous modulation due to exposure to fungal antigens, we evaluated *in vitro* the ability of differentiated dendritic cells from circulating monocytes from Pb18 infected mice to stimulate proliferation of CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes, we analyzed the ability of dendritic cells derived from circulating monocytes from mice infected with *P. brasiliensis* pulsed with P10 to induce a protective response. Our results are promising and reinforce data already published by the group which demonstrated the efficiency of the peptide P10 in the treatment of experimental paracoccidioidomycosis; suggest that P10 is capable of actively modulating differentiated dendritic cells from circulating and differentiated monocytes from bone marrow cells; demonstrate that BMDCs and MoDCs pulsed or not with P10 have the ability to

stimulate proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes; confirmed that BMDC and MoDCs pulsed or not with P10 decrease the fungal load in lung tissue, stimulating a pattern of mixed cytokines but with a predominance of pro-inflammatory cytokines that stimulate Th1-type cellular immune response that is protective in PCM, these data were supported with analysis of the histological sections where the lungs of the mice treated with BMDCs or MoDCs pulsed or not with P10 showed more conserved pulmonary parenchyma compared to the lungs of the groups that did not receive treatment with BMDCs or MoDCs, with significant decrease of viable fungal cells.

Descriptors: paracoccidioidomycosis, dendritic cells, P10 peptide, vaccine, *Paracoccidioides brasiliensis*, mice, cytokines

Lista de ilustrações

- Figura 1: Mapa epidemiológico da PCM. (Adaptado de MARTINEZ, 2017). (Azul) Primeiras áreas reconhecidas como de alta endemia, (Vermelho) Áreas de alta endemia reconhecidas a partir de 1990, (Marron) Áreas com recentes evidências de aumento de endemia, (Laranja) Áreas com moderada endemia, (Amarelo) Áreas com baixa endemia.30
- Figura 2: Mapa de distribuição das novas espécies do fungo do gênero *Paracoccidioides*, proposta pela nova reclassificação. (Adaptado de Turissini, et al., 2017). Em amarelo (S1) a espécie *P. Brasiliensis*; em vermelho (PS2) a espécie *P. Americana*; em azul (PS3) a espécie *P. retrepiensis*; em roxo (PS4) a espécie *P. venezuelensis*.35
- Figura 3: Ciclo de infecção pelo fungo do gênero *Paracoccidioides* spp., inicia-se pela inalação de fragmentos de hifas e/ou conídios que se encontram no solo, as estruturas amarelas representas em (1) são referente ao fungo na sua forma filamentosa no solo, as estruturas amarelas em (2) são fragmentos e conídios presente em aerossóis que são inalados e vão se instalar no pulmão (3 e 4), as estruturas amarelas em (5) são o fungo já em sua forma de levedura que se dissemina pelo corpo causando a Paracoccidioidomicose (6). (Fonte: <https://goo.gl/FPHqb9>) 37
- Figura 4: Identificação e caracterização do Peptídeo 10. O gráfico demonstra proliferação de células sensibilizadas com a glicoproteína gp43, induzida por 25 peptídeos oriundos da fragmentação da gp43, onde Taborda *et al.*, 1998, verificou que o décimo fragmento, peptídeo 10 ou P10 foi o único que gerou resposta induzindo proliferação (*Infect Immun* 66: 786-793).43
- Figura 5: Estratégia de análise utilizada para caracterização fenotípica e perfil de ativação das células dendríticas diferenciadas a partir de células de medula óssea (BMDC), provenientes de camundongos infectados ou não com isolado virulento de Pb18, pulsados ou não com P10. As células separadas no primeiro quadrante foi de acordo com o tamanho x granulosidade (FSC-A x SSC-A), no segundo gate foram selecionados as células vivas utilizando marcadores de viabilidade (Live/Dead – Pacific Blue), as células vivas foram selecionadas para o duplo positivo CD11c⁺MHC-II⁺ (BMDC), as BMDCs foram separadas em subpopulações de células dendríticas CD8⁺ e CD8⁻, após a separação das subpopulações, foi analisado o perfil de ativação pela expressão da intensidade media de fluorescência (MFI) das moléculas CD80, MHC-II, e CD86.56.
- Figura 6: Estratégia de análise utilizada para caracterização fenotípica e perfil de ativação das células dendríticas diferenciadas a partir de células de medula óssea (BMDC), provenientes de camundongos infectados ou não com isolado virulento de Pb18, pulsados ou não com P10. As células separadas no primeiro quadrante foi de acordo com seu tamanho x granulosidade (FSC-A x SSC-A), no segundo quadrante foram selecionados as células vivas utilizando marcadores de viabilidade (Live/Dead – Pacific Blue), as células vivas foram selecionadas para o duplo positivo CD11c⁺MHC-II⁺ (BMDC), as BMDCs foram separadas em subpopulações de células dendríticas CD8⁺ e CD8⁻, após a separação das subpopulações, foi analisado o perfil de ativação pela expressão da intensidade media de fluorescência (MFI) das moléculas CD80, MHC-II e CD86.62.

- Figura 7: Estratégia de análise utilizada para caracterização fenotípica e perfil de ativação das células dendríticas diferenciadas a partir de células de medula óssea (BMDC), provenientes de camundongos infectados ou não com isolado virulento de Pb18, pulsados ou não com P10. As células separadas no primeiro quadrante foi de acordo com o tamanho x granulosidade (FSC-A x SSC-A), no segundo quadrante foram selecionados as células vivas utilizando marcadores de viabilidade (Live/Dead – Pacific Blue), as células vivas foram selecionadas para o duplo negativo Ly6C-CD115- monócitos diferenciados, o terceiro quadrante foi feito na população duplo positivo CD11c⁺MHC-II⁺ (MoDC) diferenciadas, as MoDCs foram separadas em subpopulações de células dendríticas CD8⁺ e CD8⁻, após a separação das subpopulações, foi analisado o perfil de ativação pela expressão da intensidade media de fluorescência (MFI) das moléculas CD80, MHC-II, e CD86.64
- Figura 8: Estratégia utilizada para analisar o ensaio de proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺: no primeiro quadrante foi selecionado a população de linfócitos de acordo com a granulosidade X tamanho (SSC-A X FSC-A), o segundo quadrante foram selecionadas as células vivas, dentro do quadrante de células vivas foram selecionados os linfócitos T células CD3⁺. Dentro da população de linfócitos T foram feitos dois quadrantes onde foram selecionados linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺, a análise de proliferação foi feita dentro de cada população de linfócitos, analisando a fluorescência do CFSE.....61
- Figura 9: Esquematização do modelo experimental (infecção, tratamento e sacrifício.....67
- Figura 10: Porcentagens de células dendríticas (CD11C⁺MHC-II⁺) diferenciadas a partir de monócitos de sangue total em diferentes concentrações combinadas de IL-4 e GM-CSF. As análises estatísticas foram feitas em combinações entre todos os grupos utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde *p <0.05 e **p <0.01...71
- Figura 11: Porcentagem de células de medula óssea diferenciadas em células dendríticas (BMDC) e porcentagem dos subtipos CD8⁺ e CD8⁻ obtidos, as medulas ósseas foram obtidas a partir de camundongos saudáveis (BMDC) ou infectados com Pb18 (Infec BMDC).....72
- Figura 12: Porcentagem de células de medula óssea diferenciadas em células dendríticas (MoDC) e porcentagem dos subtipos CD8⁺ e CD8⁻ obtidos, as medulas ósseas foram obtidas a partir de camundongos saudáveis (MoDC) ou infectados com Pb18 (Infec MoDC).74
- Figura 13: Porcentagem de células dendríticas presente no baço e linfonodo de camundongos infectados ou não com Pb18. A comparação estatística foi feita entre o grupo não infectados (Baço C- ou Linfonodo C-) com o grupo infectado (Baço C+ ou Linfonodo C+).76
- Figura 14: Perfil de ativação dos subtipos de DCs presentes no baço de camundongos infectados ou não com Pb18. As análises estatísticas dentro dos subtipos de DCs foi feita entre o grupo de baço C- (baço de camundongos não infectado), com o grupo baço C+ (baço de camundongos infectados).....77
- Figura 15: Perfil de ativação dos subtipos de DCs presentes no Linfonodo de camundongos infectados ou não Pb18. As análises estatísticas dentro dos subtipos de DCs foi feita entre o grupo linfonodo C- (linfonodo de camundongos não infectado), com o grupo Linfonodo C+ (linfonodo de camundongos infectados).....78

- Figura 16: Proliferação de linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos infectados com Pb18, estimulados com BMDC pulsadas ou não com P10. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Espleno (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde *p <0.05 e **p <0.01 e ##p<0.01.....80
- Figura 17: Proliferação de linfócitos T CD4⁺ provenientes de camundongos infectados com Pb18, estimulados com BMDC pulsadas ou não com P10. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde *p <0.05 e ##p<0.01..81
- Figura 18: Proliferação de linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos infectados com Pb18, estimulados com MoDC pulsadas ou não com P10. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo MoDC P10 e o grupo MoDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde *p <0.05, **p<0.01 e #p<0.05.....82
- Figura 19: Proliferação de linfócitos T CD4⁺ provenientes de camundongos infectados com Pb18, estimulados com MoDC pulsadas ou não com P10. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo MoDC P10 e o grupo MoDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde ***p<0.001 e ##p<0.01.....83
- Figura 20: Análise da citocina IL-12p70 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde **p<0.01 e #p<0.05....84
- Figura 21: Análise da citocina IFN- γ no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde *p<0.05.84
- Figura 22: Análise da citocina TNF- α no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC,

utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde $**p<0.01$ e $###p<0.001$.
.....85

Figura 23: Análise da citocina IL-4 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde $***p<0.001$ e $###p<0.001$85

Figura 24: Análise da citocina IL-6 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde $***p<0.001$, $****p<0.0001$ e $###p<0.0001$87

Figura 25: Análise da citocina IL-2 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde $*p<0.05$, $****p<0.0001$ e $###p<0.001$87

Figura 26: Análise da citocina IL-17A no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata.88

Figura 27: Análise da citocina IL-10 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata.88

Figura 28: Análise da citocina IL-12p70 no sobrenadante da co-cultura de MoDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde $*p<0.05$.
.....89

Figura 29: Análise da citocina IFN- γ no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde $**p<0.01$, $***p<0.001$ e $##p<0.01$90

Figura 30: Análise da citocina IL-6 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de

esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde $**p<0.01$ e $##p<0.01$. 91

Figura 31: Análise da citocina IL-10 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle e (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde $***p<0.0001$ e $##p<0.01$91

Figura 32: Análise da citocina IL-4 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde $**p<0.01$, $***p<0.0001$ e $##p<0.01$92

Figura 33: Análise da citocina TNF- α no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde $**p<0.01$ e $***p<0.001$93

Figura 34: Análise da citocina IL-17A no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde $***p<0.001$93

Figura 35: Análise da citocina IL-2 no sobrenadante da co-cultura de MoDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata.94

Figura 36: Unidades Formadoras de Colônia de pulmão de camundongos BALB/c, infectados intratraquealmente com 3×10^5 leveduras de Pb18 e tratados pela via subcutânea com BMDC ou MoDC pulsadas ou não com o peptídeo P10. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+). (*) indica diferença estatística, com $*p<0,05$, $***p<0.001$ entre o grupo controle positivo e os outros grupos. # indica diferença estatística, com $##p<0,01$, do grupo MoDC em relação ao grupo MoDC P10 e entre os grupos BMDC e BMDC P10.95

Figura 37: Dosagem das citocinas IL-12p70, no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+).96

Figura 38: Dosagem das citocinas TNF- α no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+).97

- Figura 39: Dosagem das citocinas IFN- γ no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+).97
- Figura 40: Dosagem das citocinas IL-2 no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+).98
- Figura 41: Dosagem das citocinas MCP-1 no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+). (*) indica diferença estatística, com $**p < 0.01$, entre o grupo controle positivo e os outros grupos.98
- Figura 42: Dosagem das citocinas IL-10 no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+).99
- Figure 43: Dosagem das citocinas IL-4 no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+).99
- Figure 44: Dosagem das citocinas IL-17^A no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+). (*) indica diferença estatística, com $*p < 0.05$ e $***p < 0.001$, entre o grupo controle positivo e os outros grupos.96
- Figure 45: Dosagem das citocinas IL-6, no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle, animais infectados e não tratados (C+). (*) indica diferença estatística, com $**p < 0.01$ e $***p < 0.001$, entre o grupo controle positivo e os outros grupos.97
- Figure 46: Exame histológico de um fragmento do pulmão dos animais estudados. Os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 30 dias esses receberam diferentes tratamentos. Os grupos são: A) animais não infectados não tratados; B) animais infectados e não tratados; C) animais tratados com células dendríticas diferenciadas de medula óssea (BMDC); D) animais tratados com células dendríticas de monócitos (MoDC); E) animais tratados com BMDC pulsadas com P10 (BMDC P10); F) animais tratados com MoDC pulsadas com P10 (MoDC P10). Em A1, B1, C1, D1, E1 e F1 correspondem a um aumento de 50 vezes, e as pranchas A2, B2, C2, D2, E2 e F2 correspondem a um aumento de 100 vezes (Nikon Eclipse E200). Lâminas coradas pelo método de Gomori-Grocott.99
- Figure 47: Cortes histológicos, corados por HE, de pulmão de camundongos BALB/c infectados com Pb18. Os grupos são: A) animais não infectados não tratados; B) animais infectados e não tratados; C) animais tratados com células dendríticas diferenciadas de medula óssea (BMDC); D) animais tratados com células dendríticas

de monócitos (MoDC); E) animais tratados com BMDC pulsadas com P10 (BMDC P10)
; F) animais tratados com MoDC pulsadas com P10 (MoDC P10). Em A1, B1, C1, D1, E1
e F1 correspondem a um aumento de 50 vezes, e as pranchas A2, B2, C2, D2, E2 e F2
correspondem a um aumento de 100 vezes (Nikon Eclipse E200).105

Lista de Tabelas

Tabela 1: Anticorpos monoclonais utilizadas para separação fenotípica das células dendríticas e seus subtipos CD8 ⁺ e CD8 ⁻ presentes no baço e linfonodo de camundongos infectados ou não com Pb18 e também foi analisado perfil de ativação dos subtipos de DCs.....	56
Tabela 2: Anticorpos monoclonais utilizados para separação fenotípica das células dendríticas diferenciadas de células de medula óssea ou diferenciadas de monócitos circulantes, provenientes de camundongos infectados ou não com Pb18.	61
Tabela 3: Painel de anticorpos monoclonais utilizados para análise de ativação das BMDCs e MoDCs de camundongos infectados ou não com Pb18, pulsados ou não com P10....	62
Tabela 4: Perfil de ativação das BMDC diferenciadas de células de medula óssea provenientes de camundongos infectados ou não com Pb18, e DMDC pulsadas ou não com P10. (+) indica aumento estatisticamente significativo para os grupos em comparação com o grupo BMDC.....	74
Tabela 5: Perfil de ativação das MoDC diferenciadas de células de medula óssea provenientes de camundongos infectados ou não com Pb18, e MoDC pulsadas ou não com P10. (+) indica aumento estatisticamente significativo para os grupos em comparação com o grupo MoDC.....	76

Sumario

1 Introdução	30
1.1 Paracoccidioidomicose	30
1.2 Agente etiológico	35
1.3 Tratamento e adversidades	38
1.4 Paracoccidioidomicose e o sistema imune	39
1.5 Peptídeo 10 (P10).....	42
1.6 Células Dendríticas	43
1.7 Vacinas em doenças fúngicas	47
1.8 Paracoccidioidomicose e Células Dendríticas	48
2 Justificativa.....	50
3 Objetivos	52
3.1 Objetivo geral	52
3.2 Objetivos específicos.....	52
4 Materiais e Métodos	54
4.1 Animais	54
4.2 Isolados.....	54
4.3 Infecção intratraqueal (i.t.)	55
4.4 Caracterização de células dendríticas	55
4.5 Obtenção de células mononucleares	57
4.6 Diferenciação dos Monócitos periféricos em células dendríticas (MoDCs) <i>in vitro</i>	58
4.7 Diferenciação de células dendríticas a partir de células de medula óssea (BMDC) <i>in vitro</i>	55
4.8 Purificação das células dendríticas	55
4.9 Apresentação do P10 para as BMDCs e MoDCs.....	60

4.10 Análise em citômetro de fluxo das BMDCs e MoDCs.....	61
4.11 Co-cultura e análise de proliferação de linfócitos usando Carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE)	64
4.12 Vacina terapêutica	67
4.13 Determinação de carga fúngica pulmonar	68
4.14 Detecção de citocinas pelo método de “Cytometric Bead Array” (CBA)	68
4.15 Histologia.....	70
4. 16 Análise Estatística.....	70
5 Resultados.....	71
5.1 Padronização da diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos de sangue periférico in vitro	71
5.2 Diferenciação de BMDCs e MoDCs de camundongos saudáveis ou infectados.....	72
5.3 Análise das células dendríticas presentes no baço e linfonodos de camundongos infectados ou não	76
5.4 Proliferação utilizando CFSE	79
5.5 Dosagem das citocinas do sobrenadante da co-cultura de BMDCs com esplenócitos .	83
5.6 Dosagem das citocinas do sobrenadante da co-cultura de MoDCs com esplenócitos ..	89
5.7 Análise de carga fúngica através das unidades formadoras de colônias	94
5.8 Análise das citocinas no pulmão dos camundongos infectados e tratados com BMDCs ou MoDCs pulsadas ou não com P10.....	95
5.9 Análise de cortes histológicos.....	101
6 Discussão.....	107
7 Conclusões	117

1 Introdução

1.1 Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de aspecto granulomatoso, causada pelo fungo termodimórfico do gênero *Paracoccidioides*. A doença foi descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz, ao verificar lesões bucais em dois pacientes no Brasil em 1908, sendo denominada inicialmente por Blastomicose Sul-Americana ou Doença de Lutz-Splendore revisado por (Lacaz, Porto et al. 1991), porém o termo Paracoccidioidomicose foi estabelecido em 1971 (Lacaz, Zamith et al. 1982).

A PCM é considerada um grave problema de Saúde Pública, devido à existência de extensas áreas endêmicas, é uma doença de alto potencial incapacitante, e por causar grande número de mortes prematuras. Apesar do tratamento medicamentoso ser relativamente eficaz, o tempo prolongado necessário de uso das drogas e os efeitos colaterais provocados, podem levar a diminuição de adesão ao tratamento, o que favorece casos de recidiva da doença em formas mais agressivas.

A PCM é endêmica e considerada a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina (Figura 1), reportada desde o sul do México até o norte da Argentina e afetando principalmente o Brasil com 80% dos casos, seguido pela Colômbia e Venezuela (Brummer, Castaneda et al. 1993); (Martinez 2015). Casos atípicos ou autóctones foram notificados no Chile, Suriname, Guiana, Nicarágua e Belize (Retrepo et al., 2003; Restrepo, Benard et al. 2008). Alguns casos de importação foram relatados nos EUA, Europa e Ásia (Buitrago, Bernal-Martinez et al. 2011). Um aspecto interessante na distribuição da doença é que países onde a

PCM é endêmica, não se observa uma distribuição homogênea da doença e sim em certas regiões que oferecem condições aparentemente favoráveis para o fungo (Restrepo, McEwen et al. 2001).

Figura 1: Mapa epidemiológico da PCM. (Adaptado de MARTINEZ, 2017). (Azul) Primeiras áreas reconhecidas como de alta endemicidade, (Vermelho) Áreas de alta endemicidade reconhecidas a partir de 1990, (Laranja) Áreas com recentes evidências de aumento de endemicidade, (Marron) Áreas com moderada endemicidade, (Amarelo) Áreas com baixa endemicidade.

A PCM não é uma doença de notificação compulsória no Brasil, o que dificulta saber ao certo qual é realmente a população acometida. No entanto, no Brasil as estimativas de incidência anual variam de 0,71 a 3,7 casos por 100.000 habitantes (Martinez 2017) e registros recentes de incidência em Rondônia relatam 9,4 casos por 100.000 habitantes, com dois municípios relatando incidências próximas a 40 casos por 100.000 habitantes (Vieira, Alves et al. 2014).

No Brasil a PCM é considerada a oitava causa de morte entre as doenças crônicas infecciosas resultando em 1,65 mortes por 10^6 habitantes (Coutinho,

Caramalho et al. 2005). Dados de mortalidade informados pelo Ministério da Saúde apontam que aproximadamente 1.853 (~51.2%) das 3583 mortes confirmadas no Brasil devido a micoses sistêmicas entre 1996-2006 foram causados por PCM (Prado, Silva et al. 2009). Os índices de mortalidade mais elevados dessa micose foram encontrados na região Sudeste, especialmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e na região Sul, nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul (Prado, Silva et al. 2009). É importante chamar a atenção para o aumento significativo de óbitos nas novas fronteiras agrícolas do Brasil, nas regiões Centro Oeste (Mato Grosso) e Norte (Rondônia e Acre) (Prado, Silva et al. 2009).

Epidemiologicamente, a PCM apresenta maior incidência em pacientes do sexo masculino, com idades entre 30 e 50 anos, em uma proporção de homem para mulher de (13:1), proporção a qual pode variar de acordo com as regiões analisadas, sendo que a mesma não se aplica na infância, onde a micose é distribuída uniformemente entre ambos os sexos, com ligeira predominância do masculino (Brummer, Castaneda et al. 1993, Restrepo, Salazar et al. 2005, Restrepo, Benard et al. 2008). A doença no homem pode se desenvolver desde o momento em que o fungo entra em contato com o hospedeiro, ou passar por um período de latência que pode ser de meses a vários anos. Devido a este período de latência, existe uma grande dificuldade em determinar o local preciso onde o paciente foi infectado (Brummer, Castaneda et al. 1993, Restrepo 1994). Essa grande diferença observada em pacientes do sexo masculino na idade adulta pode ser explicada pelo fato das mulheres estarem mais protegidas devido à presença de estrógenos endógenos que atuam através das proteínas ligantes no citosol do fungo, inibindo assim a transformação de micélio ou conídio em levedura (Stover, Schar et al. 1986). Assim, sem a interferência hormonal, a infecção pode aparecer

em mulheres antes da puberdade ou depois da menopausa (Shankar, Restrepo et al. 2011).

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

Vários estudos têm sido realizados para classificar as formas clínicas da PCM, tais como, topografia das lesões, gravidade da doença, resultados de reações sorológicas, história natural, entre outros. Atualmente, a classificação utilizada foi estipulada e apresentada no *International Colloquium on Paracoccidioidomycosis* e no II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose de 2017, caracterizando a doença em PCM infecção, onde o indivíduo saudável teve contato com o fungo do gênero *Paracoccidioides* spp, mas não desenvolveu a doença; PCM doença a qual apresenta a forma aguda/subaguda (juvenil) e forma crônica (adulta); e PCM forma residual, também chamada sequelar, caracterizada pelas manifestações clínicas causadas pelas cicatrizes que se seguem ao tratamento da PCM (Shikanai-Yasuda, Mendes et al., 2017).

A forma aguda/subaguda atinge principalmente indivíduos jovens. Esta forma é de curso rápido, durando cerca de semanas a meses, e as manifestações mais predominantes são linfadenomegalia e lesões de pele (Shikanai-Yasuda, Telles Filho et al. 2006; Shikanai-Yasuda, Mendes et al. 2017). Esta forma da doença é responsável por cerca de 5-25% dos casos (Shikanai-Yasuda, Mendes et

al., 2017), sendo observado que os pacientes apresentam altos níveis de anticorpos específicos e resposta imune celular comprometida. A resposta imune desenvolvida por pacientes com a forma aguda e subaguda leva à formação de granulomas frouxos, os quais são constituídos por poucas células inflamatórias, mal organizadas e contendo numerosas células fúngicas viáveis em seu interior (Franco 1987).

A forma crônica representa cerca de 74 a 96% dos casos da doença (Shikanai-Yasuda, Mendes et al., 2017), que corresponde à grande maioria dos casos, afeta principalmente homens adultos entre 30 e 60 anos, é de curso lento e a principal manifestação é pulmonar. A doença também pode se disseminar para outros órgãos como mucosa, tegumento, gânglios, baço, fígado e órgãos linfóides do tubo digestivo (Shikanai-Yasuda, Telles Filho Fde et al. 2006, Shikanai-Yasuda, Mendes et al., 2017). A progressão da doença é lenta e os sintomas são observados muitos anos depois da infecção pelo fungo, devido à reativação de focos quiescentes. Ocorre significativa morbidade em razão da insuficiência pulmonar causada pela fibrose, que é observada em 32% dos pacientes com a forma crônica (Shikanai-Yasuda, Telles Filho Fde et al. 2006, Restrepo, Benard et al. 2008). Estas fibroses são uma severa e progressiva sequela que altera as funções respiratórias e incapacita o paciente nas suas atividades diárias, tornando-se um problema econômico-produtivo (Tobon, Agudelo et al. 2003, Naranjo, Lopera et al. 2011). Os primeiros sinais e sintomas da doença, embora não sejam específicos, incluem: tosse, expectoração, falta de ar, perda de peso, febre e anorexia (Brummer, Castaneda et al. 1993).

1.2 Agente etiológico

Os fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* são encontrados na forma de micélio a 17-18 °C, composto por micélios aéreos finos, ramificados e providos de septos; clamidósporos laterais e intercalares podem ser observados em algumas culturas, assim como estruturas reprodutoras assexuais (conídios) (Restrepo, 2003, Restrepo, Benard et al. 2008). Já na temperatura de 36-37 °C, em cultura ou no hospedeiro, apresenta forma de levedura unicelular, com múltiplos brotamentos, revisto por (Restrepo, Benard et al. 2008). Os fungos do gênero *Paracoccidioides* pertencem à família *Ajellomycetacea*, da ordem *Onygenales*, onde também estão inclusos outros fungos termodimórficos de importância clínica (Untereiner, Scott et al. 2004). O gênero *Paracoccidioides* é constituído de duas espécies: *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) e *Paracoccidioides lutzii* (Pl), e 4 espécies crípticas: S1a e S1b, PS2, PS3 e PS4 (Martinez 2017). Com o avanço das técnicas de biologia molecular foi proposto uma reclassificação destas espécies crípticas para espécies de fato definidas, sendo: *P. brasiliensis* (S1), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3) e *P. venezuelensis* (PS4) (Turissini, Gomez et al. 2017) (Figure 2).

Figura 2: Mapa de distribuição das novas espécies do fungo do gênero *Paracoccidioides*, proposta pela nova reclassificação. (Adaptado de Turissini, et al., 2017). Em amarelo (S1) a espécie *P. Brasiliensis*; em vermelho (PS2) a espécie *P. Americana*; em azul (PS3) a espécie *P. retrepiensis*; em roxo (PS4) a espécie *P. venezuelensis*.

Alguns aspectos epidemiológicos de *Paracoccidioides* spp. são menos compreendidos do que em outros fungos causadores de micoses sistêmicas, como por exemplo, acredita-se que o habitat natural deste fungo seja o solo de regiões tropicais e subtropicais da América Latina (Brummer, Castaneda et al. 1993, Wanke, Merkle et al. 1994).

A infecção com *Paracoccidioides* spp. ocorre preferencialmente através das vias respiratórias (Figura 3), por inalação de propágulos fúngicos (fragmentos de hifas e/ou conídios) (Bagagli, Bosco et al. 2006), ao manipular o solo gerando aerossóis. O primeiro contato entre o fungo e o hospedeiro ocorre nos alvéolos

pulmonares, onde irá acontecer a mudança da sua morfologia para forma de levedura devido ao aumento da temperatura para 36-37°C, iniciando-se assim a infecção. A partir dos pulmões, o fungo pode disseminar-se por vias linfáticas e hematogênicas para acometer outros órgãos como fígado, baço, ossos e sistema nervoso central (Sandberg, Eloranta et al. 1991, San-Blas 1993, San-Blas, Nino-Vega et al. 2002, Valera, Mori et al. 2008). Outra evidência que o habitat natural do fungo seja o solo, vem do isolamento esporádico do fungo de amostras do solo e órgãos internos de tatus, mas apesar disso o nicho ecológico do fungo continua ainda sendo hipotético (Negroni 1966, Restrepo 1985, Ferreira, Freitas et al. 1990, Bagagli, Sano et al. 1998, Silva-Vergara, Martinez et al. 2000, Bagagli, Franco et al. 2003). Os tatus estão em contato direto com a terra, onde podem se contaminar e ajudar a espalhar os fragmentos do fungo. Eles apresentam temperatura corporal e quantidade de células imunes que favorecem o fungo a evoluir para sua forma zoofílica. O fungo *Paracoccidioides* spp. também já foi isolado de cachorros (de Farias, Condas et al. 2011), bichos-preguiça (Trejo-Chavez and Nevarez-Garza 2011), pinguins e morcegos (Grose and Tamsitt 1965, Garcia, Del Negro et al. 1993).

Figura 3: Ciclo de infecção pelo fungo do gênero *Paracoccidioides* spp., inicia-se pela inalação de fragmentos de hifas e/ou conídios que se encontram no solo, as estruturas amarelas representas em (1) são referente ao fungo na sua forma filamentosa no solo, as estruturas amarelas em (2) são fragmentos e conídios presente em aerossóis que são inalados e vão se instalar no pulmão (3 e 4), as estruturas amarelas em (5) são o fungo já em sua forma de levedura que se dissemina pelo corpo causando a Paracoccidioidomicose (6). (Fonte: <https://goo.gl/FPHqb9>)

1.3 Tratamento e adversidades

O tratamento da PCM exige um tempo prolongado para obter um resultado bem sucedido (Restrepo, Stevens et al. 1980). Na forma crônica da doença as drogas sulfonamidadas e os azólicos são classicamente utilizadas, enquanto que anfotericina B e seus derivados são utilizados nas formas mais avançadas da doença. Um dos problemas dos longos períodos de tratamento é a toxicidade da anfotericina B e das outras drogas utilizadas no tratamento (Restrepo, Stevens et al. 1980, McEwen, Bedoya et al. 1987). Ainda que essas drogas possam diminuir a progressão da PCM, as sequelas fibróticas persistem, princípio que pode levar a ocorrência de recidivas por *Paracoccidioides* spp. ao término da longa fase de tratamento. Uma das características do *Paracoccidioides* spp. é sua habilidade de se tornar ativo após um prolongado período de dormência, o que é comum em

pacientes que vivem em áreas endêmicas que podem apresentar infecção várias décadas depois (Brummer, Castaneda et al. 1993).

Devido a estes fatores apresentados, estudos para novas propostas de tratamento para PCM veem sendo realizadas, e o conhecimento de aspectos estruturais de proteínas e peptídeos antifúngicos é fundamental, permitindo a definição de sequências reativas e a importância de determinados aminoácidos, investigados através de mutações sítio-dirigidas ou outros processos. De modo particular, peptídeos são apresentados pelos complexos de histocompatibilidade que determinam o reconhecimento de sequências próprias e não próprias para efeito de respostas imunes ativas ou de tolerância imunológica. Tais peptídeos fúngicos têm sido explorados largamente na constituição de vacinas juntamente com adjuvantes apropriados.

1.4 Paracoccidioidomicose e o sistema imune

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. apresentam uma estrutura complexa de proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos, lipídeos e polipeptídeos que reúnem condições físico-químicas e biológicas para atuarem como antígenos (San-Blas and San-Blas 1977, San-Blas, San-Blas et al. 1989). Estes antígenos são reconhecidos pelas células da resposta imune inata como monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, e células Natural Killer (NK), que por sua vez desempenham um papel central na resistência ao fungo (Calich, da Costa et al. 2008), já que estas células constituem a primeira linha de defesa do corpo e entra em contato com *P. brasiliensis* assim que ele se instala nos pulmões. A participação das células do sistema imune inato na reação inflamatória e na atividade fungicida

é induzida pelo fungo e por citocinas produzidas pelas células do sistema imune durante sua interação com fagócitos (Calvi, Peracoli et al. 2003).

As células NK foram estudadas no sangue periférico de pacientes com a PCM e no modelo experimental em hamster (Peracoli, Fortes et al. 1995). Estas células apresentam atividade citotóxica diminuída quando se tem a doença, sugerindo distúrbio imunológico associado à depressão da imunidade celular tanto em pacientes quanto no modelo experimental (Peracoli, Fortes et al. 1995).

Os neutrófilos exercem um importante papel imunoprotetor na fase inicial da defesa, a produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio são essenciais nesse processo (Reeves et al., 2003). Em camundongos suscetíveis à PCM (B10.A), a depleção dos neutrófilos resultou em um aumento nos níveis de anticorpos IgG1, IgA e IgG3 relacionados com a secreção de IL-4, TGF- β e IFN- γ , respectivamente. Já em animais resistentes (A/J), houve a produção de altos títulos de IgG2a, IgG3 e IgG2b, os quais são isotipos Th1 ou IFN-reguladores, desta forma os neutrófilos são fundamentais em situações onde a imunidade mediada por células está debilitada (Pina, Saldiva et al. 2006). Recentemente, foi demonstrado que neutrófilos parecem ser importante na fase aguda (24 e 96 horas) da infecção, uma vez que a depleção destas células, 24 horas antes da infecção, resultou em maior carga fúngica pulmonar (Pino-Tamayo et al., 2016). Em contrapartida, a depleção dos neutrófilos na fase crônica da doença tem efeito inverso. Isto é, há resolução da doença, sugerindo assim que os neutrófilos nesse contexto são prejudiciais (Puerta-Arias et al., 2016). Deste modo, fica claro o envolvimento dual dos neutrófilos na PCM.

Outras células que desempenham um papel importante na resposta à infecção por *P. brasiliensis* são os monócitos e macrófagos (M ϕ), sendo a ativação

destas células um dos primeiros eventos da resposta imune inata para combater o fungo. Esta ativação é induzida pelo reconhecimento de antígenos fúngicos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (Nakaira-Takahagi, Golim et al. 2011). Também é possível ativar os Mø por ação do IFN- γ , o qual induz um aumento na produção de óxido nítrico (NO), potencializando assim a atividade microbicida dos Mø. O papel do NO no controle da infecção por *P. brasiliensis* é importante tanto na fase micelial (Gonzalez, de Gregori et al. 2000) quanto na fase leveduriforme no modelo *in vivo* (Bocca, Hayashi et al. 1998). No entanto o papel do NO na PCM permanece controverso, já que a produção excessiva de NO pode estar relacionada com susceptibilidade no processo de infecção (Nascimento, Calich et al. 2002).

As células dendríticas (DCs) são as principais células apresentadoras de antígeno e recentes estudos experimentais têm demonstrado que a infecção com o *P. brasiliensis* ativa estas células a migrar para a região dos nódulos linfáticos, providenciando o primeiro contato para a posterior ativação de uma resposta do tipo Th1 (Silvana dos Santos, Ferreira et al. 2011). DCs pulsadas com P10 foram capazes de reduzir a carga fúngica nos pulmões de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* em associação ou não com drogas antifúngicas (Magalhaes, Ferreira et al. 2012, Silva, Dias et al. 2017).

1.5 Peptídeo 10 (P10)

Estudos de imunoprecipitação demonstraram que a glicoproteína de 43 kDa (gp43) é reconhecida em quase 100% dos soros de pacientes com PCM causada por *P. brasiliensis*, enquanto em pessoas saudáveis a Gp43 não era reconhecida (Puccia and Travassos 1991). Assim, a gp43 tem sido vista como o principal marcador sorológico da PCM, aumentando a especificidade e a sensibilidade dos testes sorológicos (Camargo, Gesztes et al. 1994); (Taborda and Camargo 1994).

A gp43 possui 416 aminoácidos, onde um peptídeo composto por 15 aminoácidos, denominado Peptídeo 10 ou P10, foi caracterizado (Taborda, Juliano et al. 1998). O peptídeo P10 tem a capacidade de estimular linfócitos T CD4⁺ Th₁ produtores de IFN- γ e IL-2 (Taborda, Juliano et al. 1998) (Figura 4). O peptídeo P10 é reconhecido pelos linfócitos T de camundongos infectados com o fungo ou imunizados com a gp43 purificada. A imunização com o peptídeo P10 em camundongos BALB/c reduziu a carga fúngica pulmonar em 200 vezes comparando-se com os animais controles não tratados (Taborda, Juliano et al. 1998).

Este peptídeo, quando associado às drogas comumente utilizadas no tratamento da paracoccidioidomicose, apresenta um efeito aditivo no modelo experimental utilizando camundongos BALB/c, o que demonstra a capacidade do peptídeo P10 em auxiliar na diminuição do tempo de tratamento desta micose (Marques, da Silva et al. 2006).

Figura 4: Identificação e caracterização do Peptídeo 10. O gráfico demonstra proliferação de células sensibilizadas com a glicoproteína gp43, induzida por 25 peptídeos oriundos da fragmentação da gp43, onde Taborda *et al.*, 1998, verificou que o décimo fragmento, peptídeo 10 ou P10 foi o único que gerou resposta induzindo proliferação (*Infect Immun* 66: 786-793).

1.6 Células Dendríticas

As células dendríticas foram descritas pela primeira vez por (Steinman and Cohn 1973), ao observarem diferentes populações celulares no baço de camundongos. Os autores relataram a diferença morfológica dessas células, que apresentam forma estrelar com formações de pseudópodes, chamados de dendrítos, e por essa razão receberam o nome de células dendríticas. As DCs tiveram mais destaque ainda quando verificou-se que elas participam ativamente do processo de rejeição à transplantes. No entanto, muitos fatores contribuíam para dificultar a compreensão das funções das DCs, tais como a escassez de marcadores específicos, a dificuldade em distingui-las de monócitos e macrófagos, bem como os problemas envolvendo as técnicas de purificação. Os estudos sugeriram que as DCs pertencem à uma população rara de leucócitos, com complexa heterogeneidade fenotípica e funcional, especializadas em processar e

apresentar antígenos, dando início à resposta imune inata e adaptativa dos linfócitos T (Hart 1997)(Banchereau and Steinman 1998)(Lin, Jacek et al. 2006).

Desde então, as células dendríticas começaram a ser extensivamente pesquisadas e se tornaram alvo de diversas pesquisas. Na década de 1980, as DCs foram consideradas células apresentadoras de antígenos (APCs). Estas células são altamente eficientes na captura, processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T e B (Constantino, Gomes et al. 2017). Expressam elevado nível de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), moléculas co-estimulatórias e moléculas adesivas, um pré-requisito para a ativação de linfócitos T (Lin, Jacek et al. 2006).

As DCs são oriundas de células pluripotentes CD34⁺ presentes na medula óssea e se diferenciam em duas vias principais: a via mieloide e a via linfoide (Banchereau and Steinman 1998, Gogolak, Rethi et al. 2003)(Cruvinel Wde, Mesquita et al. 2010), e ainda são subdivididas de acordo com seu estágio de maturação, em imaturas e maduras (Lutz and Schuler 2002).

As linhagens mielóides ou linfóides são diferenciadas pelo marcador CD11c. As células dendríticas mielóides (mDC) têm o fenótipo CD11c⁺/CD123⁻, secretam IL-12 e uma grande variedade de citocinas e quimiocinas em resposta a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Banchereau and Steinman 1998). Estas células são semelhantes às DCs derivadas de monócitos, que são geradas *in vitro* após estímulos dos monócitos com GM-CSF e IL-4 (Sallusto and Lanzavecchia 1994). As células dendríticas linfóides foram inicialmente caracterizadas como uma população imatura, CD11c⁻, chamadas de pré-pDCs (precursoras das pDCs). Esta população é distinta das mDCs CD11c⁺, possuindo o fenótipo CD11c⁻

/CD123⁺/CD303⁺(BCDA-2)/CD304⁺(BCDA-4) e correspondendo quantitativamente à 1,4% das células mononucleares do sangue periférico (Sandberg, Eloranta et al. 1991)(Pulendran, Smith et al. 1999).

As principais diferenças fenotípicas entre as subpopulações de DCs são a expressão diferencial dos marcadores CD11b, CD8 e B220. As DCs que expressam B220 apresentam quantidades intermediárias da molécula CD11c em sua superfície e são denominadas “células dendríticas plasmocitóides” (pDCs). As DCs caracterizadas pela alta expressão de CD11c são denominadas “células dendríticas convencionais” (cDCs) e subdivididas em células CD8⁺ e CD8⁻, sendo que as últimas expressam a molécula CD11b. Há ainda populações de DCs caracterizadas pela expressão de CD4, concomitante ou não, com a expressão de CD8. No entanto, essa subpopulação é menos conhecida. As diferentes subpopulações de DCs apresentam, além das diferenças fenotípicas, algumas diferenças funcionais e em seu desenvolvimento (Shortman and Liu 2002, Shortman and Naik 2007, Merad, Sather, et al. 2013).

Além de poderem ser distinguidas quanto às subpopulações, as DCs podem ser diferenciadas quanto ao seu estado de ativação. Na ausência de sinais inflamatórios ou indução, as DCs imaturas possuem alta capacidade de realizar endocitose, um fenótipo caracterizado pela baixa expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II) e também das moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86, CD40, e não são boas estimuladoras de respostas de células T. Quando sinais inflamatórios estão presentes ou as DCs são expostas a componentes derivados de patógenos, seu fenótipo sofre uma alteração significativa, com um aumento na expressão de MHC II e moléculas co-estimulatórias, tornando-se capazes de estimular respostas de

células T, sendo denominadas DCs maduras (Guermonprez, Fayolle et al. 2002). Durante o processo de maturação das células dendríticas a expressão do receptor de quimiocina CCR7 se dá em outras células além das DCs, como linfócitos T e B. As quimiocinas CCL19 e CCL21 são seus únicos ligantes e estão presentes constitutivamente em células epiteliais dos órgãos linfóides secundários. Essas ligações guiam a migração das DCs maduras para linfonodos e sua fixação nas áreas de células T revisado por (Forster, Davalos-Misslitz et al. 2008). Dessa forma, o processo de maturação das DCs integra-se ao processo de migração das mesmas em direção às áreas T dos linfonodos, fazendo com que a probabilidade do encontro com um linfócito T antígeno-específico aumente (Worbs, Hammerschmidt, et al. 2016).

As células dendríticas possuem papel central na ativação de células T e na indução da resposta Th₁ e Th₂, sendo a produção de IL-12 um fator chave para essa indução. Elas regulam o balanço entre a produção de anticorpos da resposta Th₂ e a indução da resposta imune celular Th₁. A função central das células dendríticas é induzir a proliferação das células T, gerando ou ativando células T reguladoras ou T efectoras, o que irá resultar em tolerância ou imunidade, respectivamente. Também direcionam a produção de citocinas pelas células T auxiliares induzindo diferentes padrões de resposta (Shortman and Liu 2002, Decker, Xing et al. 2009).

A polarização para resposta Th₁, pelas células dendríticas, é regida por uma série de fatores que incluem o microambiente e o tipo de estímulo para maturação. As DCs carreando determinantes antigênicos que se ligam a MHC de classe I e II dão suporte para forte resposta imune celular Th₁, regulando positivamente os genes promotores de Th₁ e regulando negativamente os genes envolvidos na resposta Th₂ (Lanzavecchia and Sallusto 2001, Decker, Xing et al. 2009).

1.7 Vacinas em doenças fúngicas

A produção de vacinas a partir de proteínas (peptídeos) ou polissacarídeos é uma abordagem padrão para a vacinação (Travassos e Taborda, 2017). O uso de peptídeos como vacinas apresentam vantagens, pois estes são livres de material infeccioso e podem ser produzidos em larga escala; incluem múltiplos determinantes ou epítomos; pode ser modificado por lipídeos, hidratos de carbono ou grupos fosfato, acetilo e amida terminal para aumentar a sua estabilidade, além de poder ser ligado a macromoléculas para aumentar a imunogenicidade (Purcell, McCluskey et al., 2007, Taborda, Nosanchuk et al. 2017). A entrega de peptídeos utilizando diferentes formulações é um desafio para a criação de uma vacina eficiente, porém o uso de células dendríticas pulsadas com o peptídeo 10 (P10), como vacina profilática ou terapêutica em modelo experimental, utilizando camundongos infectados com leveduras do *P. brasiliensis*, reduziu as cargas fúngicas pulmonares (Magalhães, Ferreira et al. 2012). Usando uma abordagem semelhante, Silva et al. (2017) utilizaram células dendríticas iniciadas com P10 em combinação com a administração de trimetoprim-sulfametoxazol para tratar

camundongos imunocomprometidos infectados com *P. brasiliensis*. Os autores observaram que as células dendríticas pulsadas com P10 com ou sem drogas antifúngicas são potencialmente eficazes no combate à paracoccidioidomicose invasiva.

Os fungos patogênicos ao entrarem em contato com o hospedeiro podem induzir a produção de anticorpos, induzindo uma resposta protetora. A partir disso, vários estudos demonstraram que anticorpos monoclonais podem atuar como vacina eficaz no combate a infecções sistêmicas causadas por fungos, como por exemplo, aspergilose (Chaturvedi, Kavishwar et al., 2005), cromoblastomicose (Nimrichter, Berreto-Bergter et al., 2004), candidíase (Coleman, Oh et al., 2009), criptococose (Taborda, Rivera et al., 2003), paracoccidioidomicose (Buissa-Filho, Puccia et al., 2008), histoplasmose (Nosanchuk, Zancopé-Oliveira et al., 2012), entre outros. A principal vantagem da administração de anticorpos humanizados é que eles podem ter menos efeitos colaterais em comparação com anticorpos quiméricos ou não humanos.

1.8 Paracoccidioidomicose e Células Dendríticas

Na PCM, dados clínicos e experimentais indicam que a imunidade mediada por células desempenha papel significativo na defesa do hospedeiro contra a infecção por *Paracoccidioides* spp., resultando na formação de granulomas bem definidos e que conseguem limitar a infecção. As formas mais severas, assim como o aumento da disseminação da doença, estão associadas com uma resposta imune predominantemente humoral, com altos títulos de anticorpos específicos não

protetores e inibição da imunidade celular contra o agente infeccioso (Arango and Yarzabal 1982, Franco 1987, Brummer, Castaneda et al. 1993).

Em estudos experimentais têm sido demonstrado que a infecção com *P. brasiliensis* ativa as células dendríticas (DCs) e induz migração para regiões dos nódulos linfáticos, para posterior ativação de uma resposta protetora do tipo Th₁ (Pina, Saldiva et al. 2006).

Na PCM experimental, em camundongos resistentes (A/J) foi demonstrado que subpopulações mistas de células dendríticas (mielóides e plasmocitóides) levam a uma resposta protetora mediada pela proliferação de linfócitos efetores e reguladores (Tregs) (Pina, de Araujo et al. 2013).

Nosso grupo demonstrou que células dendríticas derivadas de medula óssea testadas no modelo experimental de PCM e usadas como adjuvante, permitiu a diminuição na quantidade de peptídeo P10 utilizado no tratamento da PCM. As células dendríticas pulsadas com o P10 foram capazes de, *in vitro*, ativar e induzir a proliferação de células de baço primadas com o peptídeo *in vivo* (Magalhaes, Ferreira et al. 2012). A vacina contendo células dendríticas pulsadas com P10, quando aplicada por via subcutânea, foi capaz de causar um aumento significativo nas citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-12 e proporcionar a diminuição na carga fúngicas nos pulmões. Além disso, foi possível observar também a diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10, o qual pode ser correlacionado com a diminuição da inflamação nesses tecidos (Magalhaes, Ferreira et al. 2012).

Tentando mimetizar a forma aguda/subaguda da doença em humanos, DCs pulsadas com P10 também foram testadas em nosso laboratório no modelo de PCM em camundongos imunossuprimidos. Como resultado foi observado que as DCs pulsadas com P10, associadas ou não com drogas antifúngicas, foram capazes

de reduzir a carga fúngica nos pulmões dos camundongos infectados (Silva, Dias et al. 2017). DCs diferenciadas a partir de medula óssea de camundongos não infectados, após serem pulsadas com o peptídeo P10, apresentaram um alto nível de expressão de MHC II e elevada produção de IL-12 em cultura *in vitro* (Magalhaes, Ferreira et al. 2012).

2 Justificativa

Com o propósito de diminuir, o tempo de tratamento, sequelas, cicatrizes deixadas pela doença e melhorar a eficácia dos tratamentos já existentes o estudo de vacinas preventivas ou terapêuticas em doenças infecciosas tem se expandido ao longo dos últimos anos.

Resultados já apresentados por nosso grupo, utilizando células dendríticas diferenciadas de medula óssea de camundongos saudáveis, pulsadas com o peptídeo 10 é um candidato promissor para uma vacina terapêutica no tratamento da paracoccidiodomicose. No entanto, até o presente momento todos os estudos utilizando células dendríticas pulsadas com P10, foram realizados com células dendríticas diferenciadas de medula óssea de camundongos saudáveis e no intuito de se aproximar ao máximo de como seria o tratamento de um paciente com paracoccidiodomicose. A proposta desse trabalho é utilizar células dendríticas diferenciadas de monócitos (MoDCs) circulantes, provenientes de camundongos infectados com isolado virulento de *P. brasiliensis* e analisar a capacidade do P10 em modular a atividade destas MoDCs.

No entanto, analisar se as MoDCs de camundongos infectados apresentam modulação prévia devido a infecção pelo fungo *P. Brasiliensis*, avaliar o efeito do

P10, frente a células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos circulantes de camundongos infectados com *P. Brasiliensis*, avaliar se as MoDCs pulsadas com o P10 tem a capacidade de estimular proliferação de células T e induzir uma resposta protetora do tipo Th₁.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Aproximar ao máximo de como seria o tratamento Paracoccidioidomicose em pacientes, avaliando o efeito terapêutico das células dendríticas diferenciadas de monócitos circulantes (MoDCs) provenientes de camundongos infectados com isolado virulento de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) pulsadas com o peptídeo P10 em modelo experimental de Paracoccidioidomise.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar as características fenotípicas das células dendríticas de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*.
- Observar se as DCs diferenciadas a partir de células de medula óssea ou de monócitos circulantes de camundongos (BALB/c) infectados apresentam modulação prévia devido à exposição a antígenos fúngicos.
- Avaliar *in vitro* a capacidade das células dendríticas (BALB/c) diferenciadas a partir de monócitos circulantes de camundongos infectados com *P. brasiliensis* pulsadas ou não com P10 em modular a resposta de linfócitos CD8⁺ e CD4⁺.
- Avaliar a capacidade de células dendríticas derivadas de monócitos circulantes de camundongos infectados com *P. brasiliensis* pulsadas ou não com P10 em induzir uma resposta protetora do tipo Th1.

- Tipificar e quantificar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias nos sobrenadantes de cultura de células dendríticas diferenciadas de monócitos (BALB/c) pulsadas com P10.
- Verificar através da análise histológica a estrutura pulmonar dos animais imunizados com MoDCs diferenciadas de camundongos infectados com *P. brasiliensis* pulsadas com P10.

4 Materiais e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos BALB/c com média de idade entre 6 e 8 semanas, obtidos do biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais utilizados neste projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo de pesquisa nº 189/14).

4.2 Isolados

O isolado virulento de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) foi mantido em meio semi-sólido Fava-Netto durante 7 dias e incubado a temperatura de 37°C. O fungo foi coletado e lavado em solução salina tamponada (PBS) por 3 vezes. Após decantação das partículas maiores, fez-se a contagem das leveduras em câmara de Neubauer. A viabilidade do inóculo de leveduras foi determinado utilizando o corante Azul de Tripan (Sigma, St. Louis, EUA) e todos os experimentos foram realizados com suspensão fúngica de viabilidade superior a 90%.

4.3 Infecção intratraqueal (i.t.)

Os camundongos foram infectados por via intratraqueal conforme descrito inicialmente por (Taborda, Juliano et al. 1998). Foi utilizado inóculo contendo 3×10^5 leveduras em 50 μ l de PBS estéril para cada camundongo. O procedimento foi realizado com os animais sob anestesia (80 mg/kg de ketamina e 10 mg/kg de xilazina). Quando os animais estavam insensíveis à dor (após 10 minutos), foi realizada uma pequena incisão longitudinal na região do pescoço e a traquéia foi exposta. Após a inoculação i.t. do fungo, a incisão foi suturada e os animais colocados sob uma fonte moderada de calor para controlar a hipotermia transitória produzida pela anestesia, até acordarem. Camundongos inoculados apenas com PBS foram utilizados como controle (sadios).

4.4 Caracterização de células dendríticas

Após 30 dias de infecção dos camundongos, foi realizada a eutanásia destes e retirados os linfonodos (inguinais, cervicais) e o baço. Os quais foram macerados delicadamente em meio RPMI-1640. A suspensão foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido a lise de hemácias adicionando-se solução hipotônica de NaCl 0,2% por 30s, seguido do mesmo volume de solução hipertônica de NaCl 1,6%, a fim de restabelecer a isotonia e evitar a morte dos outros tipos celulares. As células foram centrifugadas novamente e homogeneizadas em tampão FACS. Foi feita a marcação de moléculas de superfície para identificação das células dendríticas e alguns de seus subtipos, utilizando os anticorpos descritos (Tabela 1).

Anticorpos	Fluorocromo	Clone
CD11c	BV711	N418
CD8a	FITC	53-6.7
MHC-II	APC-Cy7	M5/114.15.2
Ly6C	BV605	AL-21
CD115	PE	AFS98
Viabilidade	EF450	

Tabela 1: Anticorpos monoclonais utilizados para separação fenotípica das células dendríticas e seus subtipos, CD8⁺ e CD8⁻ presentes no baço e linfonodo de camundongos infectados ou não com Pb18. Além disso, também foi analisado perfil de ativação dos subtipos de DCs.

Após a adição dos anticorpos, as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C. Após incubação, as células foram lavadas em tampão de FACS para retirar anticorpos não ligantes e as células foram homogeneizadas em tampão para citometria e fixadas com 1% de paraformaldeído. As amostras foram lidas no citômetro FACSFortessa LSR (BD, EUA). Os dados adquiridos foram analisados no software FlowJo (versão 10.0.5, TreeStar Inc., EUA) e a avaliação estatística no software Prism 7 (GraphPad Inc, EUA). Cada anticorpo foi previamente titulado e usado o fator de diluição 1:100 (0,5 µg/ 10⁶ células). A estratégia de análise para as células DCs pode ser visualizada na figura 5. Para cada população foi avaliada a porcentagem de células positivas e a média da intensidade de fluorescência (MFI) para análise do estado de ativação das DCs.

Figura 5: Estratégia de análise utilizada para caracterização fenotípica e perfil de ativação das células dendríticas diferenciadas a partir de células de medula óssea (BMDC), provenientes de camundongos infectados ou não com isolado virulento de Pb18, pulsados ou não com P10. As células separadas na primeira estratégia de análise foram selecionadas de acordo com seu tamanho x granulosidade (FSC-A x SSC-A), na segunda estratégia de análise foram selecionados as células vivas utilizando marcadores de viabilidade (Live/Dead – “Pacific Blue”), as células vivas foram selecionadas para o duplo positivo CD11c+MHC-II+ (BMDC), as BMDCs foram separadas em subpopulações de células dendríticas CD8+ e CD8-, após a separação das subpopulações, foi analisado o perfil de ativação pela expressão da intensidade média de fluorescência (MFI) das moléculas CD80, MHC-II, e CD86.

4.5 Obtenção de células mononucleares

Células mononucleares foram obtidas a partir do sangue de camundongos saudáveis ou infectados coletados por punção cardíaca com seringa untada em solução anticoagulante (ACD). Após a coleta, o sangue foi diluído em solução salina 0.9% (NaCl), na proporção 1:1, e transferido para um tubo cônico de 50 mL, contendo solução de Ficoll-hypaque (GE Healthy Care, EUA) e centrifugado a 2300 rpm durante 30 minutos. A fração contendo as células mononucleares derivadas de sangue periférico (PBMC) foi coletada e as células submetidas a duas lavagens com RPMI (Cultilab, Brasil), suplementado com 40 µg/ml de gentamicina (Novafarma, Brasil), 200 mM/mL de glutamina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (1500 rpm, por 10

minutos a 4°C). As células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Vitrocell - Campinas), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco Life Technologies Grand Island, NY, EUA), contadas em câmara de Neubauer, em seguida foi realizada a avaliação da viabilidade celular com o corante de Azul de Trypan.

4.6 Diferenciação dos monócitos periféricos em células dendríticas (MoDCs)

in vitro

Após realizar o protocolo acima as células foram plaqueadas em placas de 24 poços, sendo que em cada poço foi adicionado um total de 5×10^6 células em 1mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas por 2 horas em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂, a 37°C, para aderência dos monócitos. Após o período de aderência, as células não aderentes foram desprezadas e as aderentes cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco BRL Life Technologies, BR), 50 ng/ml de GM-CSF (Fator Estimulatório de Colônia de Granulócitos e Macrófagos recombinante), 35 ng/ml de IL-4 (ambos Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA) e 20 mg/ml de gentamicina (Gibco BRL Life Technologies, NY). No terceiro e quinto dia de cultura, novo meio de cultura suplementado foi adicionado as células e no oitavo foram obtidas as células dendríticas diferenciadas de monócitos (MoDCs).

4.7 Diferenciação de células dendríticas a partir de células de medula óssea (BMDC) *in vitro*

A obtenção das células dendríticas foi feita de acordo com o protocolo descrito por (Inaba, et al., 1992). Foram retirados o fêmur e a tíbia de camundongos e lavados em álcool 70%, seguido de duas lavagens em PBS. A medula óssea foi removida com o auxílio de uma seringa contendo meio RPMI (Vitrocell - Campinas). Essas células foram centrifugadas (1500 rpm, 5 minutos), ressuspensas em RPMI e quantificadas em câmara de Neubauer. As células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco BRL Life Technologies), 30 ng/ml de GM-CSF, 15 ng/ml de IL-4 (ambos Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA) e 20 mg/ml de gentamicina (Gibco BRL Life Technologies, NY). As células foram cultivadas por oito dias em estufa CO₂ 5% a 37 °C. No terceiro e quinto dia de cultura, novo meio de cultura suplementado foi adicionado às células e no oitavo foram obtidas as células dendríticas diferenciadas de monócitos (MoDCs).

4.8 Purificação das células dendríticas

Após diferenciação das BMDCs e MoDCs, foi obtida uma cultura de células heterogêneas, pois nem todas as células em cultura se diferenciaram em células dendríticas. Para diminuir a heterogeneidade da cultura de células diferenciadas, antes de ser preparada a vacina utilizada no tratamento dos camundongos infectados com Pb18, as culturas de células foram purificadas utilizando coluna magnética LD de acordo com instruções do fabricante (Miltenyi Biotec, USA). As

BMDC e MoDCs foram ressuspensas em tampão MACS (PBS, 0.5% de BSA e 2mM EDTA), contadas em Câmara de Neubauer e ajustadas a quantidade de 10^7 células no volume de 70 μ L de tampão MACS, foram acrescentado 20 μ L de “Microbeads”, CD3, CD4, CD19, F4/80 e incubados por 15 min a 4°C. Após incubação foi acrescentado 1 mL de tampão MACS e centrifugado a (1500 rpm, 10 min), para lavar “Microbeads” não ligantes. O “pellet” formado foi ressuspensado em 500 μ L de tampão MACS. A coluna LD foi conectada ao “MACS separator”, e foi passado 3mL de tampão MACS para preparar a coluna. Após a coluna estar pronta para ser usada, a amostra foi aplicada, e foi coletado a fração não ligante, após passar amostra, foi passado 3 mL de tampão MACS na coluna que também foram coletados, as células ligantes na coluna, células CD3⁺, CD4⁺, CD19⁺, F4/80⁺ foram descartadas. As células que não aderiram a coluna, células dendríticas (BMDC ou MoDCs) foram pulsadas ou não com o P10 e utilizadas para o tratamento do camundongos infectados com Pb18.

4.9 Apresentação do P10 para as BMDCs e MoDCs

As BMDCs e MoDCs foram incubadas na presença de P10 com $2,55 \times 10^1$ mM / mL do peptídeo 10 (P10) por 2 horas em estufa de CO₂ 5% a 37 °C, após essa incubação, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS estéril. Este procedimento foi repetido duas vezes para retirar o excedente de P10. As células foram utilizadas na imunização dos camundongos infectados, cada dose contendo 3×10^5 células dendríticas em 100 μ L de PBS, administrada através de da via subcutânea.

4.10 Análise em citômetro de fluxo das BMDCs e MoDCs

BMDC e MoDCs diferenciadas pulsadas ou não com P10 foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 min, o “pellet” foi ressuspensionado em PBS e incubadas por 30 min a 4°C protegidos da luz, com 50 µL de PBS contendo “Live/Dead” (“Pacific Blue”), marcador de viabilidade celular. Após incubação, foi feita duas lavagens acrescentado 300 µL de tampão FACS e centrifugando a 1500 rpm por 10 min. Posteriormente, foi adicionado 25 µL de tampão FACS contendo os anticorpos descritos na tabela 2, para caracterização fenotípica das BMDCs e MoDCs e os anticorpos da tabela 3, para caracterização e análise do perfil de ativação das BMDCs e MoDCs. As células foram incubadas por 30 minutos com os anticorpos a 4°C protegidos da luz. Após incubação as células foram lavadas duas vezes, novamente, em tampão FACS e fixadas com PFA a 1% em PBS.

Anticorpos	Fluorocromo	Clone
CD11c	BV711	N418
CD8a	FITC	53-6.7
MHC-II	APC-Cy7	M5/114.15.2
Ly6C	BV605	AL-21
CD115	PE	AFS98
Viabilidade	EF450	

Tabela 2: Anticorpos monoclonais utilizados para separação fenotípica das células dendríticas diferenciadas de células de medula óssea ou diferenciadas de monócitos circulante, provenientes de camundongos infectados ou não com Pb18.

Anticorpos	Fluorocromo	Clone
CD11c	BV711	N418
MHC-II	APC-Cy7	M5/114.15.2
CD115	PE	AFS98
Ly6C	BV605	AL-21
CD8a	FITC	53-6.7
CD80	PerCP-Cy5.5	GL-1
CD86	APC	15-10A1
Viability	EF450	

Tabela 3: Paineis de anticorpos monoclonais utilizados para análise de ativação das BMDCs e MoDCs de camundongos infectados ou não com Pb18, pulsados ou não com P10.

As amostras foram lidas no citômetro FACSFortessa LSR (BD, EUA), adquirindo um total de 100.000 eventos (quando possível) por amostra. Como controles de marcação foram usadas células não marcadas e “beads”. Controles FMOs foram usados para determinação de positivo real. Os dados adquiridos foram analisados no software FlowJo (versão 10.0.5, TreeStar Inc., EUA) e a avaliação estatística no software Prism 7 (GraphPad Inc, EUA). Cada anticorpo foi previamente titulado e usado o fator de diluição 1:100 (0,5 µg/ 10⁶ células). A estratégia de análise para as células BMDC pode ser visualizada na figura 6 e a estratégia de análise para as células MoDCs poder ser visualizada na figura 7.

Figura 6: Estratégia de análise utilizada para caracterização fenotípica e perfil de ativação das células dendríticas diferenciadas a partir de células de medula óssea (BMDC), provenientes de camundongos infectados ou não com isolado virulento de Pb18, pulsados ou não com P10. As células separadas no primeiro quadrante de acordo com seu tamanho x granulosidade (FSC-A x SSC-A), no segundo quadrante foram selecionadas as células vivas utilizando marcadores de viabilidade (Live/Dead – "Pacific Blue"), as células vivas foram selecionadas para o duplo positivo CD11c+MHC-II+ (BMDC), as BMDCs foram separadas em subpopulações de células dendríticas CD8⁺ e CD8⁻; após a separação das subpopulações, foi analisado o perfil de ativação pela expressão da intensidade média de fluorescência (MFI) das moléculas CD80, MHC-II e CD86.

Figura 7: Estratégia de análise utilizada para caracterização fenotípica e perfil de ativação das células dendríticas diferenciadas a partir de células de medula óssea (BMDC), provenientes de camundongos infectados ou não com isolado virulento de Pb18, pulsados ou não com P10. As células separadas no primeiro quadrante de acordo com seu tamanho x granulosidade (FSC-A x SSC-A), no segundo quadrante foram selecionados as células vivas utilizando marcadores de viabilidade (Live/Dead – “Pacific Blue”), as células vivas foram selecionadas para o duplo negativo Ly6C-CD115- monócitos diferenciados, o terceiro quadrante foi feito na população duplo positivo CD11c+MHC-II+ (MoDC) diferenciadas, as MoDCs foram separadas em subpopulações de células dendríticas CD8⁺ e CD8⁻; após a separação das subpopulações, foi analisado o perfil de ativação pela expressão da intensidade média de fluorescência (MFI) das moléculas CD80, MHC-II, e CD86.

4.11 Co-cultura e análise de proliferação de linfócitos usando Carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE)

As BMDCs e MoDCs, após diferenciação e purificação, foram pulsadas ou não com P10, foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 min e ressuspendidas em meio RPMI simples (25mM HEPES, 2 g/L bicarbonato de sódio de , 2 g/L glicose, 25 mg/L gentamicina). As células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando Azul de Trypan para visualizar viabilidade. As células foram ajustadas para a concentração de 4×10^4 células dendríticas para cada 100 μ L, foram plaqueadas 100 μ l por poço em placas de 96 poços fundo U.

Esplenócitos de camundongos infectados com P18 foram extraídos para realização de ensaio de linfoproliferação. Brevemente, os baços foram retirados e

macerados suavemente em 2 mL de meio RPMI. O macerado foi filtrado usando *cell strainer* de 100 μm e transferido para tubos cônicos de 15 mL estéril. Após centrifugação (1500 rpm por 10 min), as hemácias foram lisadas usando NaCl a 0,2% e 1,6%. O “pellet” celular foi ressuspensionado em 2 mL de meio RPMI, as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade foi avaliada por azul de trypan. Um total de 10^7 células foi ressuspensionado em 1 mL para marcação com CFSE (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA) o qual foi diluído e estocado segundo instruções do fabricante, o estoque é de 5 mM, diluído em DMSO, a partir desta solução estoque, 1 μL de CFSE foi diluído em 1 mL de PBS estéril acrescido de 2% de soro fetal bovino. A solução de CFSE de 1 mL foi acrescido à suspensão de esplenócitos de 1 mL e incubados por 15 min a temperatura ambiente protegidos da luz. A marcação foi interrompida com SFB gelado e as células foram lavadas e ressuspensionadas em meio RPMI completo (1% aminoácidos não essenciais, 1% piruvato de sódio, 10% soro fetal bovino, 2mM L-glutamina, 50 μM 2b-mercaptoetanol, 50 μL 0.2% ciprofloxacina) e foram novamente contadas e ajustadas em uma concentração de 2×10^5 células para cada 100 μL . 100 μL de esplenócitos marcados foram plaqueados por poço junto com as BMDCs e MoDCs pulsadas ou não com P10. Os grupos de acordo com os estímulos/condições: Esplenócitos (controle negativo, apenas Esplenócitos marcados); 4 $\mu\text{g/mL}$ de concanavalina A (ConA; controle positivo de proliferação); Esplenócitos P10 (10 μg de P10 com Esplenócitos marcados), BMDC ou MoDC (BMDC e MoDC não pulsadas com P10, com Esplenócitoas marcados); BMDC P10 ou MoDC P10 (BMDC ou MoDC pulsadas com 10 μg de P10, com esplenócitos marcados). O volume final de cada poço foi de 200 μL e as placas foram incubadas por 96 horas à 37°C em estufa de CO₂ umidificada. A proporção de BMDCs ou MoDCs e linfócitos foi de 1:5. Após 96h, o sobrenadante da co-cultura foi recolhido e guardado a -20°C para

análise de citocinas produzidas, e as células foram marcadas com os anticorpos citados na tabela 4 (0,5 µg/ 10⁶ células), por 30 minutos a 4°C. As células foram novamente lavadas em tampão FACS, fixadas com PFA a 1% e lidas no citômetro FACSFortessa LSR (BD, EUA).

Anticorpos	Fluorocromos	Clone
CD3	APC-Cy7	17A2
CD4	PE	RM4-5
CD8a	BV605	53-6.7
Viability	EF450	
CSFE	FITC	

Tabela 4: Pannel de fluorocromos e anticorpos utilizados para análise de proliferação do ensaio de co-cultura de esplenócitos com BMDC ou MoDC pulsadas ou não com P10.

A estratégia de análise pode ser visualizada na Figura 8. Controles adicionais foram usados: células não marcadas com CSFE e não estimuladas (definição do limite inferior do intervalo de proliferação); células não marcadas com CSFE e estimuladas com ConA (controle de autofluorescência induzida por proliferação); FMOs (definição dos limites positivos e interferência de cores). Os dados adquiridos foram analisados no software FlowJo (versão 10.0.5, TreeStar Inc., EUA) e a avaliação estatística no software Prism 7 (GraphPad Inc, EUA).

Figura 8: Estratégia utilizada para analisar o ensaio de proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺: no primeiro quadrante foi selecionado a população de linfócitos de acordo com Granulosidade X Tamanho (SSC-A X FSC-A), o segundo quadrante foram selecionadas as células vivas, dentro do quadrante de células vivas foram selecionados os linfócitos T células CD3⁺. Dentro da população de linfócitos T foram feitos dois quadrantes onde foram selecionados linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺, a análise de proliferação foi feita dentro de cada população de linfócitos, analisando a fluorescência do CFSE.

4.12 Vacina terapêutica

Os camundongos, após 30 dias de infecção intratraqueal com isolado virulento de *P. brasiliensis* Pb18, foram tratados com dose única das seguintes formulações vacinais: BMDC (apenas células dendríticas diferenciadas de medula óssea); BMDC P10 (células dendríticas diferenciadas de medula óssea pulsadas com P10); MoDC (apenas células dendríticas diferenciadas de monócitos); MoDC P10 (células dendríticas diferenciadas de monócitos pulsadas com P10). O modelo de infecção e tratamento é sumariada abaixo (Figura 9).

Figure 9: Esquematização do modelo experimental (infecção, tratamento e sacrifício).

4.13 Determinação de carga fúngica pulmonar

Após 30 dias do tratamento, os animais foram sacrificados e os pulmões foram excisados para análises diversas, entre elas carga fúngica. Os pulmões foram pesados, macerados em 2 mL de PBS estéril e 100 µl dessa suspensão foi semeada em meio ágar BHI suplementado com 5 % de SFB e 4 % de filtrado de cultura de *P. brasiliensis* (isolado 192). As placas foram mantidas em estufa à 37°C e as contagens das unidades formadoras de colônia (UFC) foram feitas após 10 dias.

4.14 Detecção de citocinas pelo método de “Cytometric Bead Array” (CBA)

A quantificação das citocinas foram feitas no homogeneizado de pulmão dos camundongos infectados e tratados com BMDCs ou MoDCs pulsadas ou não com P10, os pulmões foram pesados e homogeneizados na presença de inibidores de protease. O sobrenadante foi conservado a -80 °C até o momento do ensaio.

O sobrenadante da co-cultura foi recolhido após 96h de cultura e armazenado a -80 °C, para posterior análise de citocinas.

A metodologia descrita para análise das amostras de homogeneizado de pulmão e para o sobrenadante são semelhantes e é descrita a seguir. A quantificação das citocinas foi feita pelo método de “Cytometric Bead Array” (CBA), segundo instruções do fabricante (BD, EUA). Antes de analisar as amostras, foi realizada a curva padrão com as diluições (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256) definindo a concentração do padrão entre 20 - 5000 pg/ml. Após a realização do padrão, foi feita a reconstituição do Mix, no qual são adicionados 10µl do anticorpo específico para cada citocina em cada amostra. Todos os procedimentos foram realizados a temperatura de 4 °C. Após adicionar o mix foram acrescentados 50µl do anticorpo de detecção fluorocromo, PE, por amostra e estas foram protegidas da luz por 2 horas. Foram preparadas as “Setap Beads”, marcando três tubos (A, B e C): nos tubos B e C foram adicionados 50µl dos reagentes de marcação, FITC e PE respectivamente, e foram adicionados 400µl da solução de lavagem. No tubo A foram adicionados 450 µl desta solução. Os “Setap Beads” foram incubados a temperatura ambiente por 30 minutos, protegidos da luz. Após este procedimento, as amostras foram analisadas, no citometro FACSFortessa LSR (BD, EUA), e analisadas no software FCAP Array 3 (BD Bioscience). As concentrações individuais de citocinas foram indicadas por suas intensidades fluorescentes. Os padrões de citocina foram diluídos em série para facilitar a construção de curvas de calibração, que foram necessárias para determinar as concentrações das citocinas nas amostras testadas. Os limites mínimos de detecção para as citocinas nos kits utilizados foram: kit Th1 / Th2 / Th17 foram 0,1 pg / mL para IL-2, 0,03 pg / mL para IL-4, 1,4 pg / mL para IL-6, 0,5 pg / mL para IFN- γ , 0,9 pg / mL para TNF- α , 0,8 pg / mL para IL-17A e 16,8 pg / mL para IL-10 e para o kit de inflamação foram 5 pg / mL para IL-6, 17,5 pg / mL

para IL-10 , 52,7 pg / mL para MCP-1, 2,5 pg / mL para IFN- γ , 7,3 pg / mL para TNF- α , 10,7 pg / mL para IL-12p70, os resultados obtidos foram obtidos em pg / mL.

4.15 Histologia

Amostras de parte dos pulmões dos animais foram acondicionados em formalina tamponada a 10% (Merck, Alemanha) e enviadas para o laboratório de Histologia do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo para coloração. Os cortes foram submetidos à coloração HE e Gomori-Grocott.

4. 16 Análise Estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Inc., San Diego, CA) e a análise de variância (ANOVA) foi realizada seguida do pós-teste de Tukey. O resultado foi considerado significativo quando o $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Padronização da diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos de sangue periférico *in vitro*.

Na padronização da diferenciação dos monócitos de sangue periférico em células dendríticas (MoDC) foram utilizados monócitos obtidos de camundongos saudáveis estimulados com as concentrações 15, 25 e 35 ng/mL de IL-4 e 30, 40 e 50 ng/mL de GM-CSF combinadas durante 8 dias. Após 8 dias de estímulo com GM-CSF e IL-4, foi feita a marcação de moléculas de superfícies (Tabela 2). Analisando a porcentagem de células dendríticas diferenciadas obtidas após estímulo com IL-4 e GM-CSF, observamos que o grupo 35-50 (que recebeu 35ng/mL de IL-4 e 50 ng/mL de GM-CSF) obteve o melhor resultado, com um aumento significativo na quantidade de células CD11c⁺MHCII⁺. As análises estatísticas foram feitas em combinações entre todos os grupos (Figura 10).

Figure 10: Porcentagens de células dendríticas (CD11c⁺MHC-II⁺) diferenciadas a partir de monócitos de sangue total em diferentes concentrações combinadas de IL-4 e GM-CSF. As análises estatísticas foram feitas em combinações entre todos os grupos utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde *p <0.05 e **p <0.01.

5.2 Diferenciação de BMDCs e MoDCs de camundongos saudáveis ou infectados

Células de medula óssea e monócitos circulantes de camundongos saudáveis ou infectados foram submetidos a diferenciação em BMDCs e MoDCs e os seguintes grupos foram estabelecidos: células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos saudáveis (BMDC), células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos infectados (Infec BMDC), as BMDCs foram marcadas com os anticorpos indicados na tabela 2, onde foram analisados 2 subtipos de BMDCs diferenciados: CD11c⁺MHCII⁺CD8a⁻ (subtipo CD8a⁻), CD11c⁺MHCII⁺CD8a⁺ (subtipo CD8a⁺) (Figura 11). As análises estatísticas foram feitas do grupo BMDC com o grupo Infec BMDC. Como resultado, observamos que células de medula óssea provenientes de camundongos infectados tem maior propensão em se diferenciar em células dendríticas, havendo predominância de células dendríticas do subtipo CD8a⁻.

Figure 11: Porcentagem de células de medula óssea diferenciadas em células dendríticas e porcentagem dos subtipos CD8⁺ e CD8⁻ obtidos, as células dendríticas foram diferenciadas de medulas ósseas obtidas a partir de camundongos saudáveis (BMDC) ou infectados com Pb18 (Infec BMDC).

Utilizando os anticorpos indicados na tabela 3 foi analisado o perfil de ativação das BMDC diferenciadas a partir de camundongos saudáveis ou infectados pulsados ou não com P10. Os seguintes grupos experimentais foram estabelecidos: células derivadas de camundongos saudáveis (BMDC), células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos infectados (Infec BMDC), células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos saudáveis pulsados com P10 (BMDC P10) e células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos infectados pulsados com P10 (Infec BMDC P10). Os dois subtipos de células dendríticas foram analisados quanto a média de intensidade de fluorescência (MFI) das moléculas de superfície (CD80, C86, MHC-II) indicadores de ativação das células dendríticas. O

resultado apresentado na tabela 4 são referentes as análises estatísticas feitas em comparação com o grupo BMDC. Os grupos que apresentaram aumento significativo foram representados na tabela por (+). As BMDCs provenientes de camundongos infectados não apresentaram aumento significativo para as moléculas de CD80, CD86, MHC-II, para ambos subtipos de BMDCs. Já as BMDCs provenientes de camundongos infectados ou não, quando pulsadas com P10, apresentaram aumento significativo nas moléculas MHC-II e CD86 no subtipo CD8a⁻, e aumento significativo nas moléculas MHC-II, CD80, CD86 no subtipo CD8a⁺, quando comparado o grupo BMDC.

	CD8 ⁻ Subtipos			CD8 ⁺ Subtipos		
	MHC-II	CD80	CD86	MHC-II	CD80	CD86
BMDC	0	0	0	0	0	0
Infec BMDC	0	0	0	0	0	0
BMDC P10	+	0	+	+	+	+
Infec BMDC P10	+	0	+	+	0	+

Tabela 4: Perfil de ativação das células dendríticas diferenciadas de medula óssea (BMDC) diferenciadas de células de medula óssea provenientes de camundongos infectados ou não com Pb18, e BMDC pulsadas ou com P10. (+) indica aumento estatisticamente significativo para os grupos em comparação com o grupo BMDC.

Células dendríticas derivadas de monócitos de camundongos sadios (MoDC), células dendríticas derivadas de monócitos de camundongos infectados (Infec MoDC) e as MoDCs foram marcadas com os anticorpos indicados na tabela 2, onde foram analisados 2 subtipos de MoDCs diferenciados: CD11c⁺MHCII⁺CD8a⁻ (subtipo CD8a⁻), CD11c⁺MHCII⁺CD8a⁺ (subtipo CD8a⁺) (Figura 12). As análises estatísticas foram feitas do grupo MoDC com o grupo Infec MoDC. Como resultado, não foi observado diferença significativa na porcentagem de células dendríticas

diferenciadas de monócitos de camundongos infectados ou não. Do mesmo modo, já observado nas BMDCs, existe predominância de células dendríticas do subtipo CD8a⁻.

Figure 12: Porcentagem de células de medula óssea diferenciadas em células dendríticas (MoDC) e porcentagem dos subtipos CD8⁺ e CD8⁻ obtidos, as medulas ósseas foram obtidas a partir de camundongos saudáveis (MoDC) ou infectados com Pb18 (Infec MoDC).

Utilizando os anticorpos indicados na tabela 3 foi analisado o perfil de ativação das MoDC diferenciadas a partir de camundongos saudáveis ou infectados pulsados ou não com P10. Os seguintes grupos experimentais foram estabelecidos: células dendríticas derivadas de monócitos de camundongos saudáveis (MoDC), células dendríticas derivadas de monócitos de camundongos infectados (Infec MoDC), células dendríticas derivadas de monócitos de camundongos saudáveis

pulsados com P10 (MoDC P10) e células dendríticas derivadas de monócitos de camundongos infectados pulsados com P10 (Infec MoDC P10). Os dois subtipos de células dendríticas foram analisadas quanto a media de intensidade de fluorescência (MFI) das moléculas de superfície (CD80, C86, MHC-II). O resultado apresentado na tabela 5 são referentes as análises estatísticas feitas em comparação com o grupo MoDC e os grupos que apresentaram aumento significativo foram representados na tabela por (+). As MoDCs subtipo CD8a⁺ provenientes de camundongos infectados apresentaram maior expressão da molécula CD80, já as MoDCs provenientes de camundongos infectados ou não, quando pulsadas com P10 apresentaram maior expressão das moléculas MHC-II e CD86 para os subtipo CD8a⁻ e CD8a⁺, quando comparado o grupo MoDC.

	CD8 ⁻ Subtipos			CD8 ⁺ Subtipos		
	MHC-II	CD80	CD86	MHC-II	CD80	CD86
MoDC	0	0	0	0	0	0
Infec MoDC	+	0	0	+	+	0
MoDC P10	+	0	+	+	0	0
Infec MoDC P10	+	0	+	+	0	+

Tabela 5: Perfil de ativação das células dendríticas diferencias a partir de monócitos (MoDC) provenientes de camundongos infectados ou não com Pb18, e MoDC pulsadas ou com P10. (+) indica aumento estatisticamente significante para os grupos em comparação com o grupo MoDC.

5.3 Análise das células dendríticas presentes no baço e linfonodos de camundongos infectados ou não.

Camundongos sadios e infectados com Pb18, após 30 dias de infecção, foram sacrificados. Foram retirados, baços, linfonodos (cervicais e axilares) e suas células foram marcadas com anticorpos do painel 1 (Tabela 1) e analisadas através

de citometria de fluxo quanto à quantidade de células dendríticas presentes nesses órgãos. Os grupos analisados foram: baço de camundongos não infectados (Baço C-), baço de camundongos infectados (Baço C+), linfonodos de camundongos não infectados (Linfonodo C-) e linfonodo de camundongos infectados (Linfonodo C+). A comparação estatística foi feita entre os grupos infectados e os grupos não infectados. Foi observado aumento significativo na porcentagem de células dendríticas tanto no baço quanto no linfonodo dos camundongos infectados (Figura 13).

Figure 13: Porcentagem de células dendríticas presente no baço e linfonodo de camundongos infectados (C+) com P18 e baço e linfonodo de camundongos não infectados (C-). A comparação estatística foi feita entre o grupo não infectados (Baço C- ou Linfonodo C-) com o grupo infectado (Baço C+ ou Linfonodo C+).

As células dendríticas presentes no baço e linfonodos de camundongos saudáveis ou infectados também foram analisadas quanto à intensidade média de fluorescência (MFI) de MHC-II, CD80 e CD86 para caracterizar seu perfil de ativação. Para esta análise as células foram marcadas com os anticorpos apresentados na tabela 1. A figura 14 mostra análise de MFI das moléculas MHC-II, CD80 e CD86 dos subtipos de DCs presentes nos baços dos camundongos infectados ou não com P18. Foi observado aumento significativo do MFI das

moléculas de ativação dos subtipos CD8⁻ de DCs. A figura 15 mostra a análise de MFI das moléculas MHC-II, CD80 e CD86 dos subtipos de DCs presentes nos linfonodos dos camundongos infectados ou não com P18. Foi observado aumento significativo do MFI das três moléculas de ativação analisadas do grupo de camundongos infectados (Linfonodo C+) quando comparado com o grupo de camundongos não infectados (Linfonodo C-) para ambos os subtipos de DCs.

Figure 14: Perfil de ativação dos subtipos de DCs presentes no baço de camundongos infectados (C+) com Pb18 ou baço de camundongos não infectados (C-). As análises estatísticas dentro dos subtipos de DCs foi feita entre o grupo de Baço C- (baço de camundongos não infectado), com o grupo Baço C+ (baço de camundongos infectados).

Figure 15: Perfil de ativação dos subtipos de DCs presentes no linfonodo de camundongos infectados (C+) com Pb18 e linfonodo de camundongos não infectados (C-). As análises estatísticas dentro dos subtipos de DCs foi feita entre o grupo Linfonodo C⁻ (linfonodo de camundongos não infectado), com o grupo Linfonodo C⁺ (linfonodo de camundongos infectados).

5.4 Proliferação utilizando CFSE.

Após diferenciação e purificação em coluna magnética, as BMDCs e MoDCs pulsadas ou não com P10 foram plaqueadas em placas de 96 poços e colocados em cultura junto com linfócitos obtidos de camundongos infectados com Pb18, marcado com CFSE, as células ficaram em co-cultura por 96h. Os linfócitos T CD8 quando estimulados com BMDCs pulsadas ou não com P10 mostraram proliferação estatisticamente significativa quando comprado com o grupo contendo apenas esplenócitos. No entanto, o grupo BMDC P10 (esplenócitos em cultura com BMDCs pulsadas com P10) teve proliferação significativamente maior quando comparado

com o grupo BMDC (esplenócitos em cultura com BMDC não pulsadas com P10) (Figura 16).

Figura 16: Proliferação de linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos infectados com Pb18, estimulados com BMDC pulsadas ou não com P10. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito, (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde *p < 0.05 e **p < 0.01 e ##p < 0.01.

Os linfócitos T CD4 apresentaram proliferação significativa quando cultivados com BMDC P10 em comparação com o grupo Esplenócito. Houve também proliferação significativa dos linfócitos T CD4 cultivados com BMDC P10, quando comparados com o grupo BMDC (esplenócitos cultivados com BMDC não pulsadas com P10) (Figura 17).

Figura 17: Proliferação de linfócitos T CD4⁺ provenientes de camundongos infectados com Pb18, estimulados com BMDC pulsadas ou não com P10. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de Esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde *p <0.05 e ##p<0.01.

Os linfócitos T CD8 quando estimulados com MoDCs pulsadas ou não com P10 apresentaram proliferação significativamente maior quando comprado com o grupo Esplenócitos (apenas esplenócitos). No entanto, o grupo MoDC P10 (esplenócitos em cultura com MoDCs pulsadas com P10) teve proliferação significativamente maior quando comparado com o grupo MoDC (esplenócitos em cultura com MoDC não pulsadas com P10) (Figura 18).

Figura 18: Proliferação de linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos infectados com Pb18, estimulados com MoDC pulsadas ou não com P10. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de Esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo MoDC P10 e o grupo MoDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde *p <0.05, **p<0.01 e #p<0.05.

Os linfócitos T CD4⁺ apresentaram proliferação significativa quando cultivados com MoDC P10 em comparação com o grupo Esplenócito (cultura apenas de esplenócitos). Houve também proliferação significativa dos linfócitos T CD4 cultivados com MoDC P10, quando comparados com o grupo MoDC (esplenócitos cultivados com MoDC não pulsadas com P10) (Figura 19).

Figura 19: Proliferação de linfócitos T CD4⁺ provenientes de camundongos infectados com Pb18, estimulados com MoDC pulsadas ou não com P10. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de Esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo MoDC P10 e o grupo MoDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde ***p<0.001 e ##p<0.01.

5.5 Dosagem das citocinas do sobrenadante da co-cultura de BMDCs com esplenócitos.

Antes da marcação das células observadas no ensaio de proliferação celular, foi coletado o sobrenadante da co-cultura dos grupos experimentais. No sobrenadante da co-cultura do grupo BMDC P10 (esplenócitos cultivados com BMDC pulsadas com P10) foi observado aumento significativo na produção de IL-12p70 quando comparados com o grupo Esplenócitos (cultura apenas de esplenócitos) ou comparado com BMDC (esplenócitos cultivados com BMDCs não pulsados com P10) (Figura 20).

Figura 20: Análise da citocina IL-12p70 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares, as análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de Esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde $**p<0.01$ e $\#p<0.05$.

No sobrenadante da co-cultura do grupo BMDC P10 foi observado produção significativamente maior de IFN- γ em comparação com o grupo Esplenócito (Figura 21).

Figura 21: Análise da citocina IFN- γ no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares. As análises estatísticas feitas

foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de Esplenócitos), utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde * $p < 0.05$.

Maior produção de TNF e IL-4 foi observada no sobrenadante da co-cultura do grupo BMDC em comparação com os grupos Esplenócito e com o grupo BMDC P10 (Figuras 22 e 23 respectivamente).

Figura 22: Análise da citocina TNF- α no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares. As análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde ** $p < 0.01$ e ### $p < 0.001$.

Figura 23: Análise da citocina IL-4 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares. As análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde *** $p < 0.001$ e ### $p < 0.001$.

No sobrenadante da co-cultura de BMDC pulsadas ou não com P10 foi observado produção significativamente maior de IL-6 e IL-2 em comparação com o grupo Esplenócito. A produção de IL-6 e IL-2 foi maior estatisticamente no grupo BMDC em comparação com o grupo BMDC P10 (Figuras 24 e 25, respectivamente).

Figura 24: Análise da citocina IL-6 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares. As análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ e #### $p < 0.0001$.

Figura 25: Análise da citocina IL-2 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares. As análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ e ### $p < 0.001$.

As citocinas IL-17A e IL-10 não apresentaram aumento de produção no sobrenadante da cultura dos grupos experimentais (Figuras 26 e 27, respectivamente).

Figura 16: Análise da citocina IL-17A no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Figura 27: Análise da citocina IL-10 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata.

5.6 Dosagem das citocinas do sobrenadante da co-cultura de MoDCs com esplenócitos.

Antes da marcação das células observadas no ensaio de proliferação celular, foi coletado o sobrenadante da co-cultura dos grupos experimentais. No sobrenadante da co-cultura do grupo MoDC P10 foi observado produção significativamente maior de IL-12p70 em comparação com o grupo Esplenócito (Figura 28).

Figura 28: Análise da citocina IL-12p70 no sobrenadante da co-cultura de MoDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares. As análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde $*p < 0.05$.

No sobrenadante da co-cultura de MoDC pulsadas ou não com P10 foi observado produção significativamente maior de IFN- γ em comparação com o grupo Esplenócito A produção de IFN- γ foi maior estatisticamente no grupo MoDC P10 em comparação com o grupo BMDC (Figura 29).

Figura 29: Análise da citocina IFN- γ no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares. As análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e ## $p < 0.01$.

No sobrenadante da co-cultura de MoDC pulsadas ou não com P10 foi observado produção significativamente maior de IL-6, IL-10 e IL-4 em comparação com o grupo Esplenócito. A produção de IL-6, IL-10 e IL-4 foi maior estatisticamente no grupo BMDC em comparação com o grupo BMDC P10 (Figuras 30, 31 e 32, respectivamente).

Figura 30: Análise da citocina IL-6 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares. As análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde ** $p < 0.01$ e ## $p < 0.01$.

Figura 31: Análise da citocina IL-10 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares. As análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde **** $p < 0.0001$ e ## $p < 0.01$.

Figura 32: Análise da citocina IL-4 no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares. As análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), (#) diferença estatística entre o grupo BMDC P10 e o grupo BMDC, utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ e ## $p < 0.01$.

A produção de TNF- α e IL-17A foi significativamente maior para ambos os grupos MoDC e MoDC P10, em comparação com o grupo Esplenócito (Figura 33 e 34, respectivamente).

Figura 33: Análise da citocina TNF- α no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares. As análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Figura 34: Análise da citocina IL-17A no sobrenadante da co-cultura de BMDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata, apresentando resultados similares. As análises estatísticas feitas foram, (*) diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle Esplenócito (cultura apenas de esplenócitos), utilizando One-way ANOVA seguido por teste de Tukey, onde *** $p < 0.001$.

A citocina IL-2 não apresentou aumento de produção no sobrenadante da cultura dos grupos experimentais (Figuras 35).

Figura 35: Análise da citocina IL-2 no sobrenadante da co-cultura de MoDC com esplenócitos. Os experimentos foram realizados em duplicata.

5.7 Análise de carga fúngica através das unidades formadoras de colônias.

Neste protocolo, os animais infectados com 3×10^5 células de leveduras de *P. brasiliensis*, pela via intratraqueal, foram tratados com BMDCs ou MoDCs pulsadas ou não com P10, após purificação em coluna magnética. O tratamento foi aplicado através da via subcutânea, em dose única, 30 dias após infecção dos camundongos. Todos os grupos experimentais apresentaram diminuição significativa na carga fúngica quando comparados com o grupo controle que não recebeu nenhum tratamento (C+), sendo as diminuições mais significativas observadas nos grupos que receberam tratamento com MoDC e MoDC P10 (dendríticas derivadas de monócitos de camundongos infectados não pulsados com P10 ou pulsadas com P10) e BMDC P10 (dendríticas diferenciadas de células de medula óssea pulsadas com P10). No entanto, foi observado que a diminuição da carga fúngica no pulmões dos grupo BMDC P10 e MoDC P10 em

comparação com seus respectivos grupos, BMDC e MoDC, foi significativamente menor (Figura 36).

Figura 36: Unidades Formadoras de Colônia de pulmão de camundongos BALB/c, infectados intratraquealmente com 3×10^5 leveduras de Pb18 e tratados pela via subcutânea com BMDC ou MoDC pulsadas ou não com o peptídeo P10. Foram utilizados como controle, animais infectados e não tratados (C+). (*) indica diferença estatística, com $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ entre o grupo controle positivo e os outros grupos. # indica diferença estatística, com $p < 0,01$, do grupo MoDC em relação ao grupo MoDC P10 e entre os grupos BMDC e BMDC P10.

5.8 Análise das citocinas no pulmão dos camundongos infectados e tratados com BMDCs ou MoDCs pulsadas ou não com P10.

Uma fração dos pulmões dos camundongos infectados e tratados com as BMDCs ou MoDCs pulsados ou não com P10, foram pesados e homogeneizados na presença de inibidor de protease. O Sobrenadante foi conservado a -80°C até o momento do ensaio.

No homogeneizado de pulmão dos camundongos foi observado discreto aumento, e não significativo, na produção das citocinas, IL-12p70 e TNF- α , principalmente na produção de IL-12p70 nos animais do grupo tratado com MoDC P10 (camundongos tratados com MoDCs pulsadas com P10) (Figura 37). Para TNF- α o aumento foi observado principalmente nos grupos tratado com BMDC P10 e MoDC P10 (camundongos tratados com BMDCs e MoDCs pulsadas com P10) (Figura 38), em ambos os casos quando comparados com o grupo de camundongos infectados e não tratado (C+).

Figura 37: Dosagem das citocinas IL-12p70 no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+).

Figura 38: Dosagem das citocinas TNF- α no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+).

Nas figuras 39 e 40 são indicados os valores de IFN- γ e IL-2, respectivamente, onde não foi observado diferença significativa entre os grupos experimentais quando comparados com o grupo (C+).

Figura 39: Dosagem das citocinas IFN- γ no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+).

Figura 40: Dosagem das citocinas IL-2 no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+).

A figura 41 indica os valores de MCP-1 no homogeneizado de pulmão dos camundongos. Foi observado discreto aumento, mas não significativo, nos grupos de camundongos tratados com MoDC P10, BMDC e BMDC P10. No entanto, no grupo tratado apenas com MoDC o aumento foi estatisticamente significativo.

Figura 41: Dosagem das citocinas MCP-1 no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+). (*) indica diferença estatística, com $**p < 0.01$, entre o grupo controle positivo e os outros grupos.

As citocinas IL-10 e IL-4, apresentou discreta diminuição em sua quantidade nos grupos tratados com BMDC P10 e MoDC P10, quando comparado com o grupo (C+) (Figuras 42 e 43 respectivamente).

Figura 42: Dosagem das citocinas IL-10 no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+).

Figure 43: Dosagem das citocinas IL-4 no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+).

A figura 44 indica os valores de IL-17A, onde podemos observar que os animais que receberam tratamento com BMDCs e MoDCs pulsadas ou não com P10 tiveram aumento significativo da citocina IL-17A em comparação com o grupo de camundongos infectado e não tratado (C+).

Figure 44: Dosagem das citocinas IL-17A no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+). (*) indica diferença estatística, com $*p < 0.05$ e $***p < 0.001$, entre o grupo controle positivo e os outros grupos.

Os valores da citocina IL-6, apresentados na figura 45, demonstraram que nos grupos tratados com BMDC e MoDCs pulsados ou não com P10 houve diminuição significativa na quantidade de citocinas presentes no tecido.

Figure 45: Dosagem das citocinas IL-6 no sobrenadante do macerado dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. Os animais de cada grupo foram infectados com 3×10^5 leveduras. Foram utilizados como controle animais infectados e não tratados (C+). (*) indica diferença estatística, com $**p < 0.01$ e $***p < 0.001$, entre o grupo controle positivo e os outros grupos.

5.9 Análise de cortes histológicos

O pulmão dos camundongos provenientes dos grupos experimentais foram analisados por cortes histológicos pela coloração Gomori-Grocott (Figura 46). Como controles foram utilizados camundongos não infectados (Sham) (Figura 46A1 e 46A2) e o grupo com camundongos infectados e que não receberam tratamento (C+) (Figura 46B1 e 46B2). No controle infectado e não tratado, foi observado parênquima pulmonar muito comprometido, contendo muitas células fúngicas e não é observado a formação de granulomas. Por outro lado, o grupo que recebeu tratamento apenas com BMDC (Figura 46C1 e 46C2) foi possível observar a formação de granulomas com certa definição e diminuição de células fúngicas soltas no tecido. Os grupos MoDC (Figura 46D1 e 46D2), BMDC P10 (Figura 46E1 e 46E2) e MoDC P10 (Figura 46F1 e 46F2) (grupos que receberam, respectivamente, os tratamentos com BMDCs pulsadas com P10, MoDCs não pulsadas com P10 e

MoDCs pulsadas com P10), apresentaram o parênquima pulmonar mais preservado, granulomas bem definidos e contendo células fúngicas e a redução é visível na quantidade de células de leveduras fúngicas no tecido.

Figure 46: Exame histológico de um fragmento do pulmão dos animais estudados. Os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras e após 30 dias esses receberam diferentes tratamentos. Os grupos são: A) animais não infectados não tratados; B) animais infectados e não tratados; C) animais tratados com células dendríticas diferenciadas de medula óssea (BMDC); D) animais tratados com células dendríticas de monócitos (MoDC); E) animais tratados com BMDC pulsadas com P10 (BMDC P10) ; F) animais tratados com MoDC pulsadas com P10 (MoDC P10). Em A1, B1, C1, D1, E1 e F1 correspondem a um aumento de 50 vezes, e as pranchas A2, B2, C2, D2, E2 e F2 correspondem a um aumento de 100 vezes (Nikon Eclipse E200). Lâminas coradas pelo método de Gomori-Grocott.

A figura 47 corresponde aos cortes histológicos corados por hematoxilina/eosina (HE). Na análise do corte histológico do grupo Sham (Figura 47A1 e 47A2) é observado o pulmão no seu estado normal, sadio. O grupo de

animais infectados e não tratados (Figura 47B1 e 47B2) apresenta parênquima pulmonar comprometido, com grande infiltrado pulmonar, com células fúngicas viáveis em seu interior, muitos granulomas frouxos, com células fúngicas viáveis em seu interior, bem como muitas leveduras dispersas pelo tecido pulmonar. O grupo que recebeu tratamento com BMDC (Figura 47C1 e 47C2) teve a presença de granulomas compactos e com poucas células fúngicas. Os grupos que receberam tratamento com MoDC (Figura 47D1 e 47D2), BMDC P10 (Figura 47E1 e 47E2) e MoDC P10 (Figura 47F1 e 47F2), teve uma melhora importante no tecido pulmonar, haja visto a baixa recuperação de unidades formadoras de colônias apresentado acima.

Figure 47: Cortes histológicos, corados por HE, de pulmão de camundongos BALB/c infectados com Pb18. Os grupos são: A) animais não infectados não tratados; B) animais infectados e não tratados; C) animais tratados com células dendríticas diferenciadas de medula óssea (BMDC); D) animais tratados com células dendríticas

de monócitos (MoDC); E) animais tratados com BMDC pulsadas com P10 (BMDC P10) ; F) animais tratados com MoDC pulsadas com P10 (MoDC P10). Em A1, B1, C1, D1, E1 e F1 correspondem a um aumento de 50 vezes, e as pranchas A2, B2, C2, D2, E2 e F2 correspondem a um aumento de 100 vezes (Nikon Eclipse E200).

6 Discussão

A paracoccidioidomicose é uma doença que requer um tratamento longo e desgastante, tanto para o paciente quanto para o sistema público de saúde. As drogas de escolha clínica, apesar de eficazes, como a combinação sulfametoxazol-trimetoprim ou anfotericina B, possuem desvantagens como a necessidade de longos períodos de tratamento e/ou efeitos colaterais, podendo ser graves, como nefrotoxicidade (Shikanai-Yasuda, Telles Filho Fde et al. 2006, Shikanai-Yasuda, Mendes et al., 2017).

Nosso grupo ao longo dos anos apresentou diferentes estudos sobre o papel imunestimulador e imunomodulador do peptídeo P10 na PCM experimental (Taborda, Juliano et al. 1998) (de Amorim, Magalhaes et al. 2013, Muñoz, L et al. 2014). O P10 é um forte candidato vacinal, considerando que este peptídeo induz proliferação de células TCD4+, polarizando a resposta imune do tipo Th1, caracterizada pelo aumento na secreção de IFN- γ , o qual estimula a formação de granulomas que auxilia no processo de contenção das leveduras patogênicas (Taborda, Juliano et al. 1998). O IFN- γ tem a capacidade de ativar os macrófagos pulmonares, os quais tem sua atividade fungicida aumentada e auxilia na resistência à infecção por *P. brasiliensis*, enquanto a ausência na produção de IFN- γ contribui para determinar a suscetibilidade à infecção (Brummer, Hanson et al. 1988) (Kashino, Fazioli et al. 2000) (Souto, Figueiredo et al. 2000).

Uma importante célula constituinte do sistema imune inato, e descrita pela primeira vez por Steinman e Cohn (1973), são as células dendríticas, que têm um papel crítico na mediação da resposta imune inata e na indução da resposta imune

adaptativa. Desde então, as DCs, muitas vezes referidas como “adjuvantes da natureza”, foram reconhecidas como as células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), capazes de ativar respostas imunes de células T *naive* ou de memória. As DCs têm uma capacidade superior para capturar e processar antígenos para apresentação às células T e expressam altos níveis de moléculas co-estimulatórias ou co-inibitórias que determinam ativação imune ou anergia (Steinman 2012).

As DCs em sua forma imatura apresentam alta capacidade fagocitose e baixa expressão de MHC-II e também baixa expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 (Jiang, Swiggard et al. 1995) (Sallusto and Lanzavecchia 1994) (Cella, Sallusto et al. 1997). Elas estão estrategicamente posicionados nas barreiras corporais e pontos de entrada dos órgãos, como a zona marginal esplênica. Quando estimuladas ou na presença de antígenos, estas células migram para órgãos linfóides utilizando eficientes mecanismos direcionais de migração. Durante a migração as DCs vão perder suas características imaturas e passam a expressar em sua superfície grandes quantidades de MHC-II, bem como moléculas de adesão e co-estimulatórias, CD80 e CD86. As DCs agora, DCs maduras, ao chegar nos órgãos linfóides drenantes, apresentam baixa capacidade de captura de antígenos, mas são extremamente eficientes na apresentação de antígenos para células T *naive* (Cella, Sallusto et al. 1997, Forster, Schubel et al. 1999, Lammermann, Bader et al. 2008, Gatto, Wood et al. 2013). Nos órgãos linfóides, as DCs podem regular positivamente as moléculas co-estimulatórias que são necessárias para a interação com as células T e, de forma eficaz, desencadear uma resposta imune por quaisquer células T com um receptor que é específico para os complexos do

peptídeo-MHC do microrganismo sobre a superfície da DC (Shortman and Liu 2002).

Utilizando o marcador de superfície CD8 foram identificadas no baço e linfonodo dos camundongos dois subtipos de células dendríticas: DCs CD8⁺ e DCs CD8⁻ (Vremec and Shortman 1997) (Anjuere, Martin et al. 1999) (Salomon, Cohen et al. 1998) (Shortman and Naik 2007) (Vremec 2016). DCs CD8⁺ e CD8⁻ apresentam dicotomia funcional, sendo as DCs CD8⁺ eficientes APC para indução de uma resposta do tipo Th1 associada com alta produção de IL-12p70, devido sua capacidade de apresentação cruzada e ativar resposta através do CTL (Hochrein, Shortman et al. 2001). Enquanto DCs CD8⁻ apresentam preferencialmente Ag exógena e induz resposta imune do tipo Th2 (Heath, Belz et al. 2004, Dudziak, Kamphorst et al. 2007, Villadangos and Schnorrer 2007, Shortman and Heath 2010).

No presente trabalho, baços e linfonodos obtidos após 30 dias de infecção com isolado virulento de *P. brasiliensis* e de camundongos não infectados, foram analisados em citometria de fluxo. Foi observado aumento significativo na população de células dendríticas nos órgãos do grupo de camundongos infectados, podendo estar diretamente relacionado com a capacidade migratória das células dendríticas, que ao entrar em contato com patógeno recebe sinalização para a migração para os órgãos linfóides drenantes (Wilson, Young et al. 2008). Foi observado a presença dos subtipos de DCs no baço e linfonodo dos camundongos, DCs CD8⁺ e DCs CD8⁻, e estas foram analisadas quanto a expressão de MHC-II, CD80 e CD86. Quando comparadas as DCs CD8⁺ e DCs CD8⁻ de camundongos não infectados com as DCs CD8⁺ e DCs CD8⁻ de camundongos infectados, foi observado mudança de perfil de DCs imaturas, antes da infecção, para o que provavelmente

sejam DCs maduras, pois após infecção com *P. brasiliensis* tanto as DCs CD8⁺ e DCs CD8⁻ passaram a expressar quantidades estatisticamente significativa maior das moléculas MHC-II, CD80 e CD86.

Com estes resultados podemos pressupor que as DCs estão diretamente relacionadas com o combate e controle da infecção por *P. brasiliensis*, pois trabalhos já publicados corroboram com esta hipótese, demonstrando a importância das DCs em modelos experimentais de PCM em camundongos susceptíveis e resistentes a doença (Pina, de Araujo et al. 2013, de Araujo, Feriotti et al. 2017). Estudos que utilizaram células dendríticas diferenciadas a partir de células de medulas óssea de camundongos não infectados com Pb18, como proposta vacinal em conjunto com peptídeo P10, sendo estas administradas por vias subcutânea ou intravenosa em camundongos imunocompetentes, e também testadas através da via subcutânea em camundongos imunossuprimidos, apresentaram resultados promissores com diminuição da carga fúngica no tecido pulmonar, produção de citocinas e indução de citocinas que favorecem uma resposta do tipo Th1 (Magalhaes, Ferreira et al. 2012)(Silva, Dias et al. 2017).

No presente trabalho, a proposta foi de utilizar uma vacina com células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos (MoDC) circulantes, provenientes de camundongos com infecção já estabelecida por *P. brasiliensis*, com a proposta de chegar mais próximo possível de um modelo de tratamento em paciente com PCM.

Foi realizado a padronização da metodologia de obtenção e diferenciação das MoDCs, onde ficou bem estabelecido a utilização de 30 ng/mL e 50 ng/mL de IL-4 e GM-CSF, respectivamente, concentração a qual foi obtido o melhor rendimento de diferenciação com ~20% MoDCs diferenciadas. A quantidade de GM-CSF e IL-4 utilizadas para diferenciação de células dendríticas a partir de

medula óssea (BMDC) já é bem estabelecida em nosso laboratório com rendimento ~70% BMDCs diferenciadas. BMDCs e MoDCs diferenciados a partir de células de camundongos não infectados e infectados foram divididas em subtipos, BMDC CD8⁺, BMDC CD8⁻, MoDC CD8⁺ e MoDC CD8⁻, e foram analisadas quanto a possíveis modulações influenciadas pela infecção. Através dos resultados é possível observar que BMDC de ambos subtipos diferenciadas de camundongos infectados não sofrem alteração na quantidade das moléculas MHC-II, CD80, CD86 expressas em sua superfície. Quando comparadas a expressão destas mesmas em BMDC diferenciadas de camundongos não infectados, esse resultado pressupõe que a infecção não causa alterações prévias nos subtipos de BMDCs, apesar de estas serem provenientes de camundongos infectados. No entanto, ambos BMDCs CD8⁺ e CD8⁻, tanto de camundongos infectado ou não infectados, demonstraram aumento na quantidade das moléculas de superfície, MHC-II e CD86, após serem pulsadas com P10, o que demonstra a capacidade do P10 em modular BMDC CD8⁺ e CD8⁻ provenientes de camundongos infectados ou não com Pb18. Na análise das MoDCs CD8⁺ e CD8⁻ o fato dos monócitos serem oriundos de camundongos com PCM foi suficiente para alterar o perfil das MoDCs diferenciadas, onde foi observado aumento na expressão de MHC-II nas MoDC CD8⁻ e aumento em MHC-II e CD80 nas MoDCs CD8⁺. O peptídeo P10 quando apresentado para as MoDCs também foi capaz de modificar o perfil das moléculas de superfície MHC-II e CD86, e o aumento da quantidade destas moléculas nas superfícies das células deixou as MoDCs mais ativadas.

Na análise por citometria de fluxo dos subtipos de BMDC CD8⁺, CD8⁻ e MoDC CD8⁺ e CD8⁻, foi observado predominância de BMDC CD8⁻ e MoDC CD8⁻. Este subtipo descrito acima é responsável por estimular resposta imune do tipo Th2,

porém Naik e colaboradores (Naik, Proietto et al. 2005) observaram que DCs diferenciadas *in vitro* não expressam o marcador de superfície CD8, o que explica a predominância de BMDC e MoDC CD8⁻ obtidas em nossa diferenciação. Em uma diferenciação de células utilizando GM-CSF é esperado que se obtenha DCs semelhantes as encontradas em órgão linfóides (Brasel, De Smedt et al. 2000). E segundo Naik e colaboradores (Naik, Metcalf et al. 2006), a expressão de CD8 em células pré-DCs está diretamente relacionada com a expressão do marcador CD24, onde pré-DC CD24^{hi} dá origem a DCs CD8⁺. Enquanto que pré-DC CD24^{low} vai dar origem a DCs CD8⁻.

Em ambos processos de diferenciação foi obtido uma cultura de células heterogêneas, sendo 70% de BMDCs diferenciadas e 20% de MoDCs, aproximadamente. No intuito de diminuir a heterogeneidade da cultura, antes de utilizar as BMDC e MoDCs nos testes vacinais e para co-culturas, as células dendríticas foram submetidas a um processo de separação magnética, onde foram excluídas células CD3, CD4, CD19, F4/80.

Magalhães e colaboradores em 2012 evidenciaram a capacidade de células dendríticas diferenciadas de medula óssea pulsadas com P10 em estimular proliferação de linfócitos T. DCs CD8⁺ tem uma grande habilidade de primar células T CD8⁺ (Dudziak, Kamphorst et al. 2007) e DCs CD8⁺ são responsáveis por grande produção de citocina IL-12, que polariza a resposta imune para uma resposta do tipo Th1 (Maldonado-Lopez, De Smedt et al. 1999) (Farrand, Dickgreber et al. 2009). DCs CD8⁻ apresentam preferencialmente antígenos exógenos para células T CD4⁺ induzindo uma resposta Th2 (Dudziak, Kamphorst et al. 2007) (Maldonado-Lopez, De Smedt et al. 1999). DCs CD8⁻, quando expostas a peptídeos de OVA tem a capacidade de ativação de linfócitos T CD4⁺ (Bialecki,

Macho et al. 2011) e DCs CD8⁻ também podem ser grandes produtoras de IL-12, caso estas forem estimuladas por TLR ou por ligantes de CD40 (Hochrein, Shortman et al. 2001) (Maroof and Kaye 2008). DCs CD8⁺ ou CD8⁻ podem ser ativadas e estimuladas através diferentes vias, deixando assim pressuposto que o papel de indução de resposta Th1 ou Th2 varia de acordo com os ligantes encontradas por cada subtipo de DCs (Merad, Sathe et al. 2013).

Neste estudo foi observado que BMDC e MoDC isoladas de camundongos infectados com Pb18, pulsadas com P10, estimularam proliferação de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD4⁺. Analisando o sobrenadante da co-cultura dos linfócitos com as BMDCs pulsadas com P10, foi possível observar aumento na produção de citocinas pro-inflamatórias IFN- γ , IL-12, TNF e IL-2. O aumento na produção de IL-6 pode contribuir com a proliferação de linfócitos B, mas também pode ajudar no estímulo da unidade formadora de colônia de granulócitos-macrófago (GM-CSF) (Roilides, Blake et al. 1996). A análise das citocinas anti-inflamatórias produzidas no sobrenadante da co-cultura de linfócitos com BMDC, pulsadas com P10, não apresentaram alteração significantes, o que pode favorecer a indução de uma resposta protetora para PCM do tipo Th1 (Taborda, Juliano et al. 1998) (Pina, de Araujo et al. 2013).

Na análise das citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante da co-cultura de linfócitos com MoDC, pulsadas com P10, foi observado aumento significativo das citocinas IL-12p70, IFN- γ e TNF- α , as quais são importantes na PCM para proteção e evitar disseminação do fungo (Parise-Fortes, Marques et al. 2006) (Romano, Mendes-Giannini et al. 2002) (Benard 2008). Foi observado também aumento significativo da citocina IL-10, a qual tem o efeito regulatório e antagônico ao IFN- γ (Huffnagle and Deepe 2003). Porém, DCs maduras tem a capacidade de resistir ao

efeito supressor provocado pela presença de IL-10 (Koch, Bonness et al. 1996, Reis e Sousa, Hieny et al. 1997). Já a presença da IL-10 é importante na expansão de células T regulatórias que tem, dentre suas funções, controlar uma resposta excessiva inflamatória (Netea, Gow et al. 2006) (Netea MG, et al., 2006). Um aumento significativo também foi observado na quantidade de IL-17A, tem sido descrito, que as células T CD8⁺ de memória, neutrófilos, monócitos e linfócitos T CD4⁺, são células produtoras destas citocinas (Ferretti, Bonneau et al. 2003) (Zhou, Desta et al. 2005). A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória, importante no “clearance” de patógenos extracelulares e a deficiência desta citocina pode aumentar a susceptibilidade à infecção, como foi descrito em *C. albicans* (Huang, Na et al. 2004). O aumento da citocinas IL-4, principal estímulo para a produção de anticorpos IgE e para o desenvolvimento de células Th2 a partir de células T auxiliares CD4⁺ a qual é a "assinatura" da subpopulação Th2, não era esperado, porem Pina e colaboradores (2013) demonstraram utilizando camundongos susceptíveis e resistentes a paracoccidiodomicose, que uma resposta pró-inflamatória precoce leva à suscetibilidade, enquanto uma reação anti-inflamatória mediada por TGF- β contrabalanceada por uma resposta pró-inflamatória resulta em uma resistência.

Os nossos resultados indicam que o tratamento terapêutico com as BMDCs e MoDCs, tem efeito benéfico com diminuição da carga fúngica no tecido pulmonar dos camundongos. Essa redução pode estar diretamente relacionada com a produção de citocinas induzidas pelas BMDC e MoDC, discutidos e apresentados anteriormente. No tecido pulmonar foi observado perfil misto de citocinas, porém um aumento significativo na produção de IL-17, a qual é produzida por células T CD4⁺, apresentam reatividade com antígenos fúngicos,

sugerindo importância em uma resposta Th17 na defesa contra infecções fúngicas (Acosta-Rodriguez, Rivino et al. 2007) (Korn, Bettelli et al. 2009). A resposta Th17 parece ter importância na PCM, uma vez que predomina nas formas mais brandas e localizadas da doença, exercendo um papel semelhante ao observado em outras infecções fúngicas, induzindo uma resposta inflamatória local e ativando células do sistema imune inato (Conti, Shen et al. 2009) (Gaffen 2008). A quimiocina MCP-1, a qual desempenha importante papel em doenças granulomatosas, leva a atração de células mononucleares (Lu, Rutledge et al. 1998) (Sadek, Sada et al. 1998). Em nosso estudo foi possível observar um leve aumento desta quimiocina no tecido pulmonar. Foi observado também em nossos resultados a diminuição significativa na quantidade de IL-6 no tecido pulmonar dos camundongos tratados com BMDCs e MoDCs, pulsadas ou não com P10, o qual na paracoccidiodomicose pode ser partidário ao combate do fungo, pois IL-6 quando produzida em altos níveis pode inibir a produção de TNF- α , consequentemente prejudicando a ativação dos monócitos com ação fungicida contra *P. brasiliensis* (Siqueira, Campos Soares et al. 2009).

A análise histológica de fragmentos de tecido pulmonar de camundongos BALB/c infectados, coradas por hematoxilina/eosina (HE) e Gomori-Grocott, indicou um parênquima pulmonar comprometido, com intenso infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares, e grande quantidade de leveduras viáveis. Entretanto, camundongos que receberam tratamento com BMDCs e MoDCs pulsadas ou não com P10, foi possível observar parênquima pulmonar preservado, com formação de granulomas bem definidos, compactos e com menor quantidade de leveduras viáveis em seu interior.

O uso de vacinas preventivas e terapêuticas em doenças infecciosas tem se expandido e exige a seleção de componentes imunogênicos que possam levar a proteção do hospedeiro. Resultados obtidos em nosso laboratório reforçam a conclusão de que o P10 protege contra a infecção experimental e abre perspectivas para o estudo em humanos, tomando-se um importante candidato vacinal para ser testado na paracoccidiodomicose humana.

A eficácia do tratamento da PCM experimental, utilizando células dendríticas pulsadas com P10, já foram demonstradas por nosso grupo (Magalhaes, Ferreira et al. 2012) (Silva, Dias et al. 2017). Porém, as DCs utilizadas nos trabalhos anteriores eram provenientes de camundongos não infectados e diferenciadas a partir de células de medula óssea, procedimento que não é muito viável para ser realizado com paciente por ser muito invasivo a obtenção das células de medula óssea de humanos. Nossa proposta neste trabalho, utilizando células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos circulantes de camundongos infectados com P18, aproxima ao máximo de como seria um possível tratamento de pacientes com PCM, além de o protocolo para diferenciar células dendríticas de monócitos circulantes de pacientes ser menos invasivo e mais viável.

Em conclusão, os resultados obtidos nesse trabalho são promissores e indicam que células dendríticas diferenciadas de monócitos de camundongos infectados, podem ser utilizadas no tratamento da paracoccidiodomicose, sendo uma grande vantagem não ser necessário a utilização de adjuvante.

7 Conclusões

- Observamos que o tratamento com MoDCs, pulsadas ou não com P10, apresentou eficácia, levando a redução da carga fúngica e impedindo a disseminação do fungo para outros órgãos, como baço e fígado, nos camundongos infectados com isolado virulento Pb18.

- Observamos que células dendríticas diferenciadas de medula óssea de camundongos infectados não sofrem modulação quanto a expressão das moléculas de superfície (MHC-II, CD80, CD86) em comparação com células dendríticas diferenciadas de medula óssea de camundongos não infectados.

- Observamos que células dendríticas diferenciadas de monócitos de camundongos infectados expressavam maior quantidade das moléculas de superfície (MHC-II, CD80, CD86) quando comparadas com células dendríticas diferenciadas de monócitos de camundongos não infectados.

- Observamos que o peptídeo P10 tem a capacidade de modular células dendríticas diferenciadas de monócitos circulantes de camundongos infectados, fazendo com que estas células apresentem em sua superfície maior quantidade de moléculas MHC-II, CD80, CD86.

- Camundongos tratados com BMDCs ou MoDCs, pulsadas ou não com P10, apresentaram um perfil de citocinas mista de (IL-6, IL-17A, IL-4, IL-10, MCP-1, IL-2, IFN- γ , TNF e IL-12p70), com diminuição de IL-6 e aumento de IL-17A, em relação aos controles.

- Verificamos, através de cortes histológicos, que os pulmões dos camundongos tratados com BMDCs e MoDCs pulsadas com P10 apresentaram parênquima pulmonar conservado, com diminuição significativa de células fúngicas.

Referencias

1. Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto and G. Napolitani (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." Nat Immunol **8**(6): 639-646.
2. Almeida, I. C., E. G. Rodrigues and L. R. Travassos (1994). "Chemiluminescent immunoassays: discrimination between the reactivities of natural and human patient antibodies with antigens from eukaryotic pathogens, *Trypanosoma cruzi* and *Paracoccidioides brasiliensis*." J Clin Lab Anal **8**(6): 424-431.
3. Anjuere, F., P. Martin, I. Ferrero, M. L. Fraga, G. M. del Hoyo, N. Wright and C. Ardavin (1999). "Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse." Blood **93**(2): 590-598.
4. Arango, M. and L. Yarzabal (1982). "T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis." Mycopathologia **79**(2): 115-123.
5. Bagagli, E., S. M. Bosco, R. C. Theodoro and M. Franco (2006). "Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen." Infect Genet Evol **6**(5): 344-351.
6. Bagagli, E., M. Franco, M. Bosco Sde, F. Hebelers-Barbosa, L. A. Trinca and M. R. Montenegro (2003). "High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study." Med Mycol **41**(3): 217-223.
7. Bagagli, E., A. Sano, K. I. Coelho, S. Alquati, M. Miyaji, Z. P. de Camargo, G. M. Gomes, M. Franco and M. R. Montenegro (1998). "Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis." Am J Trop Med Hyg **58**(4): 505-512.
8. Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-252.
9. Benard, G. (2008). "An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis." Mycopathologia **165**(4-5): 209-221.
10. Bialecki, E., E. Macho Fernandez, S. Ivanov, C. Paget, J. Fontaine, F. Rodriguez, L. Lebeau, C. Ehret, B. Frisch, F. Trottein and C. Faveeuw (2011). "Spleen-resident CD4+ and CD4- CD8alpha- dendritic cell subsets differ in their ability to prime invariant natural killer T lymphocytes." PLoS One **6**(10): e26919.

11. Bocca, A. L., E. E. Hayashi, A. G. Pinheiro, A. B. Furlanetto, A. P. Campanelli, F. Q. Cunha and F. Figueiredo (1998). "Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response." J Immunol **161**(6): 3056-3063.
12. Brasel, K., T. De Smedt, J. L. Smith and C. R. Maliszewski (2000). "Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures." Blood **96**(9): 3029-3039.
13. Brummer, E., E. Castaneda and A. Restrepo (1993). "Paracoccidioidomycosis: an update." Clin Microbiol Rev **6**(2): 89-117.
14. Brummer, E., L. H. Hanson, A. Restrepo and D. A. Stevens (1988). "In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*." J Immunol **140**(8): 2786-2789.
15. Buissa-Filho, R., Puccia, R., Marques, A. F. F., Pinto, F. A. A., Muñoz, J. E., Nosanchuk, J. D. D., et al. (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.
16. Buitrago, M. J., L. Bernal-Martinez, M. V. Castelli, J. L. Rodriguez-Tudela and M. Cuenca-Estrella (2011). "Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis." J Travel Med **18**(1): 26-33.
17. Cacere, C. R., M. J. Mendes-Giannini, A. C. do Valle, A. J. Duarte and G. Benard (2009). "Altered ex vivo expression of caspase 8, caspase 9, and Bcl-2 is associated with T-cell hyporeactivity in patients with paracoccidioidomycosis." Clin Vaccine Immunol **16**(6): 953-955.
18. Chaturvedi, A. K., Kavishwar, A., Shiva Keshava, G. B., and Shukla, P. K. (2005). "Monoclonal immunoglobulin G1 directed against *Aspergillus fumigatus* cell wall glycoprotein protects against experimental murine aspergillosis". *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 1063–1068.
19. Calich, V. L., T. A. da Costa, M. Felonato, C. Arruda, S. Bernardino, F. V. Loures, L. R. Ribeiro, R. de Cassia Valente-Ferreira and A. Pina (2008). "Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection." Mycopathologia **165**(4-5): 223-236.
20. Calvi, S. A., M. T. Peracoli, R. P. Mendes, J. Marcondes-Machado, D. Fecchio, S. A. Marques and A. M. Soares (2003). "Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients." Microbes Infect **5**(2): 107-113.

21. Camargo, Z. P., J. L. Gesztes, E. C. Saraiva, C. P. Taborda, A. P. Vicentini and J. D. Lopes (1994). "Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis." J Clin Microbiol **32**(10): 2377-2381.
22. Cella, M., F. Sallusto and A. Lanzavecchia (1997). "Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells." Curr Opin Immunol **9**(1): 10-16.
23. Coleman, D. A., Oh, S. H., Zhao, X., Zhao, H., Hutchins, J. T., Vernachio, J. H., et al. (2009). Monoclonal antibodies specific for *Candida albicans* Als3 that immunolabel fungal cells *in vitro* and *in vivo* and block adhesion to host surfaces. *J. Microbiol. Methods* **78**, 71–78.
24. Constantino, J., C. Gomes, A. Falcao, B. M. Neves and M. T. Cruz (2017). "Dendritic cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances." Immunol Res **65**(4): 798-810.
25. Conti, H. R., F. Shen, N. Nayyar, E. Stocum, J. N. Sun, M. J. Lindemann, A. W. Ho, J. H. Hai, J. J. Yu, J. W. Jung, S. G. Filler, P. Masso-Welch, M. Edgerton and S. L. Gaffen (2009). "Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis." J Exp Med **206**(2): 299-311.
26. Conti-Diaz, I. A., B. J. Alvarez, E. Gezuele, H. Gonzalez Marini, J. Duarte and J. Falcon (1972). "[Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **14**(6): 372-376.
27. Coutinho, A., I. Caramalho, E. Seixas and J. Demengeot (2005). "Thymic commitment of regulatory T cells is a pathway of TCR-dependent selection that isolates repertoires undergoing positive or negative selection." Curr Top Microbiol Immunol **293**: 43-71.
28. Cruvinel Wde, M., D. Mesquita, Jr., J. A. Araujo, T. T. Catelan, A. W. de Souza, N. P. da Silva and L. E. Andrade (2010). "Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response." Rev Bras Reumatol **50**(4): 434-461.
29. de Almeida JRF, Santiago LK, et al. (2017). "The Efficacy of Humanized Antibody against the *Sporothrix* Antigen, gp70, in Promoting Phagocytosis and Reducing Disease Burden". *Front. Microbiol*; **8**:345
30. de Amorim, J., A. Magalhaes, J. E. Munoz, G. M. Rittner, J. D. Nosanchuk, L. R. Travassos and C. P. Taborda (2013). "DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis induces long-term protection in presence of regulatory T cells." Microbes Infect **15**(3): 181-191.

31. de Araujo, E. F., C. Feriotti, N. A. L. Galdino, N. W. Preite, V. L. G. Calich and F. V. Loures (2017). "The IDO-AhR Axis Controls Th17/Treg Immunity in a Pulmonary Model of Fungal Infection." Front Immunol **8**: 880.
32. de Farias, M. R., L. A. Condas, M. G. Ribeiro, M. Bosco Sde, M. D. Muro, J. Werner, R. C. Theodoro, E. Bagagli, S. A. Marques and M. Franco (2011). "Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly." Mycopathologia **172**(2): 147-152.
33. Decker, W. K., D. Xing, S. Li, S. N. Robinson, H. Yang, D. Steiner, K. V. Komanduri and E. J. Shpall (2009). "Th-1 polarization is regulated by dendritic-cell comparison of MHC class I and class II antigens." Blood **113**(18): 4213-4223.
34. Dudziak, D., A. O. Kamphorst, G. F. Heidkamp, V. R. Buchholz, C. Trumpfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H. W. Lee, C. G. Park, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig (2007). "Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo." Science **315**(5808): 107-111.
35. Farrand, K. J., N. Dickgreber, P. Stoitzner, F. Ronchese, T. R. Petersen and I. F. Hermans (2009). "Langerin+ CD8alpha+ dendritic cells are critical for cross-priming and IL-12 production in response to systemic antigens." J Immunol **183**(12): 7732-7742.
36. Ferreira, M. S., L. H. Freitas, S. Lacaz Cda, G. M. del Negro, N. T. de Melo, N. M. Garcia, C. M. de Assis, A. Salebian and E. M. Heins-Vaccari (1990). "Isolation and characterization of a Paracoccidioides brasiliensis strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil." J Med Vet Mycol **28**(3): 253-256.
37. Ferretti, S., O. Bonneau, G. R. Dubois, C. E. Jones and A. Trifilieff (2003). "IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger." J Immunol **170**(4): 2106-2112.
38. Fontana, F. F., C. T. dos Santos, F. M. Esteves, A. Rocha, G. F. Fernandes, C. C. do Amaral, M. A. Domingues, Z. P. De Camargo and M. L. Silva-Vergara (2010). "Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil." Mycopathologia **169**(3): 159-165.
39. Forster, R., A. C. Davalos-Misslitz and A. Rot (2008). "CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance." Nat Rev Immunol **8**(5): 362-371.
40. Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf and M. Lipp (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." Cell **99**(1): 23-33.
41. Franco, M. (1987). "Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis." J Med Vet Mycol **25**(1): 5-18.

42. Gaffen, S. L. (2008). "An overview of IL-17 function and signaling." Cytokine **43**(3): 402-407.
43. Garcia, N. M., G. M. Del Negro, E. M. Heins-Vaccari, N. T. de Melo, C. M. de Assis and S. Lacaz Cda (1993). "[Paracoccidioides brasiliensis, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*)]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **35**(3): 227-235.
44. Gatto, D., K. Wood, I. Caminschi, D. Murphy-Durland, P. Schofield, D. Christ, G. Karupiah and R. Brink (2013). "The chemotactic receptor EBI2 regulates the homeostasis, localization and immunological function of splenic dendritic cells." Nat Immunol **14**(5): 446-453.
45. Gogolak, P., B. Rethi, G. Hajas and E. Rajnavolgyi (2003). "Targeting dendritic cells for priming cellular immune responses." J Mol Recognit **16**(5): 299-317.
46. Gonzalez, A., W. de Gregori, D. Velez, A. Restrepo and L. E. Cano (2000). "Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia." Infect Immun **68**(5): 2546-2552.
47. Grose, E. and J. R. Tamsitt (1965). "*Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A." Sabouraudia **4**(2): 124-125.
48. Guernonprez, P., C. Fayolle, M. J. Rojas, M. Rescigno, D. Ladant and C. Leclerc (2002). "In vivo receptor-mediated delivery of a recombinant invasive bacterial toxoid to CD11c + CD8 alpha -CD11bhigh dendritic cells." Eur J Immunol **32**(11): 3071-3081.
49. Hart, D. N. (1997). "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." Blood **90**(9): 3245-3287.
50. Heath, W. R., G. T. Belz, G. M. Behrens, C. M. Smith, S. P. Forehan, I. A. Parish, G. M. Davey, N. S. Wilson, F. R. Carbone and J. A. Villadangos (2004). "Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens." Immunol Rev **199**: 9-26.
51. Hochrein, H., K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog and M. O'Keeffe (2001). "Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets." J Immunol **166**(9): 5448-5455.
52. Huang, W., L. Na, P. L. Fidel and P. Schwarzenberger (2004). "Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice." J Infect Dis **190**(3): 624-631.

53. Huffnagle, G. B. and G. S. Deepe (2003). "Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi." Curr Opin Microbiol **6**(4): 344-350.
54. Jiang, W., W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig (1995). "The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing." Nature **375**(6527): 151-155.
55. Kashino, S. S., R. A. Fazioli, C. Cafalli-Favati, L. H. Meloni-Bruneri, C. A. Vaz, E. Burger, L. M. Singer and V. L. Calich (2000). "Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production." J Interferon Cytokine Res **20**(1): 89-97.
56. Koch, P. E., M. S. Bonness, H. Lu and T. J. Mabry (1996). "Protoplasts from *Phytolacca dodecandra* L'Herit (endod) and *P. americana* L. (pokeweed)." Plant Cell Rep **15**(11): 824-828.
57. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.
58. Lacaz, C. S., E. Porto and J. E. C. Martins (1991). "Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico." **8**: 695.
59. Lacaz, C. S., V. A. Zamith, G. Del Nengro and A. M. Siguiera (1982). "Aspectos clínicos gerais: formas polares da Paracoccidioidomicose. Particularidades clínicas, infantojuvenis. ." 141-147.
60. Lammermann, T., B. L. Bader, S. J. Monkley, T. Worbs, R. Wedlich-Soldner, K. Hirsch, M. Keller, R. Forster, D. R. Critchley, R. Fassler and M. Sixt (2008). "Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing." Nature **453**(7191): 51-55.
61. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2001). "Regulation of T cell immunity by dendritic cells." Cell **106**(3): 263-266.
62. Lin, K. W., T. Jacek and R. Jacek (2006). "Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity." J Cancer Res Ther **2**(2): 35-40.
63. Lu, B., B. J. Rutledge, L. Gu, J. Fiorillo, N. W. Lukacs, S. L. Kunkel, R. North, C. Gerard and B. J. Rollins (1998). "Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice." J Exp Med **187**(4): 601-608.
64. Lutz, M. B. and G. Schuler (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" Trends Immunol **23**(9): 445-449.

65. Magalhaes, A., K. S. Ferreira, S. R. Almeida, J. D. Nosanchuk, L. R. Travassos and C. P. Taborda (2012). "Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*." Clin Vaccine Immunol **19**(1): 23-29.
66. Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain and M. Moser (1999). "CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo." J Exp Med **189**(3): 587-592.
67. Maroof, A. and P. M. Kaye (2008). "Temporal regulation of interleukin-12p70 (IL-12p70) and IL-12-related cytokines in splenic dendritic cell subsets during *Leishmania donovani* infection." Infect Immun **76**(1): 239-249.
68. Marques, A. F., M. B. da Silva, M. A. Juliano, L. R. Travassos and C. P. Taborda (2006). "Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*." Antimicrob Agents Chemother **50**(8): 2814-2819.
69. Martinez, R. (2015). "Epidemiology of *Paracoccidioidomycosis*." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **57 Suppl 19**: 11-20.
70. Martinez, R. (2017). "New Trends in *Paracoccidioidomycosis* Epidemiology." J Fungi (Basel) **3**(1).
71. McEwen, J. G., V. Bedoya, M. M. Patino, M. E. Salazar and A. Restrepo (1987). "Experimental murine *paracoccidioidomycosis* induced by the inhalation of conidia." J Med Vet Mycol **25**(3): 165-175.
72. Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller and A. Mortha (2013). "The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting." Annu Rev Immunol **31**: 563-604.
73. Muñoz, J. E., V. D. Luft, J. Amorim, A. Magalhaes, L. Thomaz, J. D. Nosanchuk, L. R. Travassos and C. P. Taborda (2014). "Immunization with P10 peptide increases specific immunity and protects immunosuppressed BALB/c mice infected with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*." Mycopathologia **178**(3-4): 177-188.
74. Naik, S. H., D. Metcalf, A. van Nieuwenhuijze, I. Wicks, L. Wu, M. O'Keeffe and K. Shortman (2006). "Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes." Nat Immunol **7**(6): 663-671.
75. Naik, S. H., A. I. Proietto, N. S. Wilson, A. Dakic, P. Schnorrer, M. Fuchsberger, M. H. Lahoud, M. O'Keeffe, Q. X. Shao, W. F. Chen, J. A. Villadangos, K. Shortman and L. Wu (2005). "Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell

equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures." J Immunol **174**(11): 6592-6597.

76. Nakaira-Takahagi, E., M. A. Golim, C. F. Bannwart, R. Puccia and M. T. Peracoli (2011). "Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes." Med Mycol **49**(7): 694-703.

77. Naranjo, T. W., D. E. Lopera, L. R. Diaz-Granados, J. J. Duque, A. M. Restrepo and L. E. Cano (2011). "Combined itraconazole-pentoxifylline treatment promptly reduces lung fibrosis induced by chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in mice." Pulm Pharmacol Ther **24**(1): 81-91.

78. Nascimento, F. R., V. L. Calich, D. Rodriguez and M. Russo (2002). "Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility." J Immunol **168**(9): 4593-4600.

79. Negroni, P. (1966). "[The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina]." Prensa Med Argent **53**(39): 2381-2382.

80. Netea, M. G., N. A. Gow, C. A. Munro, S. Bates, C. Collins, G. Ferwerda, R. P. Hobson, G. Bertram, H. B. Hughes, T. Jansen, L. Jacobs, E. T. Buurman, K. Gijzen, D. L. Williams, R. Torensma, A. McKinnon, D. M. MacCallum, F. C. Odds, J. W. Van der Meer, A. J. Brown and B. J. Kullberg (2006). "Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors." J Clin Invest **116**(6): 1642-1650.

81. Nimrichter, L., Barreto-Bergter, E., Mendonça-Filho, R. R., Kneipp, L. F., Mazzi, M. T., Salve, P., et al. (2004). "A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages." *Microbes Infect.* **6**, 657-665.

82. Nosanchuk, J. D., Zancopé-Oliveira, R. M., Hamilton, A. J., and Guimarães, A. J. (2012). "Antibody therapy for histoplasmosis". *Front. Microbiol.* **3**:21

83. Parise-Fortes, M. R., S. A. Marques, A. M. Soares, C. S. Kurokawa, M. E. Marques and M. T. Peracoli (2006). "Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment." Br J Dermatol **154**(4): 643-650.

84. Peracoli, M. T., M. R. Fortes, M. F. Da Silva and M. R. Montenegro (1995). "Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **37**(2): 129-136.

85. Pina, A., E. F. de Araujo, M. Felonato, F. V. Loures, C. Feriotti, S. Bernardino, J. A. Barbuto and V. L. Calich (2013). "Myeloid dendritic cells (DCs) of mice susceptible to paracoccidioidomycosis suppress T cell responses whereas myeloid and plasmacytoid DCs from resistant mice induce effector and regulatory T cells." Infect Immun **81**(4): 1064-1077.
86. Pina, A., P. H. Saldiva, L. E. Restrepo and V. L. Calich (2006). "Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts." J Leukoc Biol **79**(6): 1202-1213.
87. Pino-Tamayo PA, Puerta-Arias JD, Lopera D, Urán-Jiménez ME, González Á. Depletion of Neutrophils exacerbates the Early Inflammatory Immune Response in Lungs of Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mediators of Inflammation*, 2016; 1-17.
88. Prado, M., M. B. Silva, R. Laurenti, L. R. Travassos and C. P. Taborda (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**(3): 513-521.
89. Puccia, R. and L. R. Travassos (1991). "43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease." J Clin Microbiol **29**(8): 1610-1615.
90. Puerta-Aries JD, Pino-Tamayo PA, Arango JC, Gonzalez A. Depletion of neutrophils promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS ONE*, 2016; 11(9): 1-23
91. Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky and C. R. Maliszewski (1999). "Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 1036-1041.
92. Purcell, A. W., McCluskey, J., and Rossjohn, J. (2007). More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 404–414.
93. Reis e Sousa, C., S. Hieny, T. Schariton-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain and A. Sher (1997). "In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas." J Exp Med **186**(11): 1819-1829.
94. Restrepo, A. (1985). "The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved." Sabouraudia **23**(5): 323-334.
95. Restrepo, A. (1994). "Treatment of tropical mycoses." J Am Acad Dermatol **31**(3 Pt 2): S91-102.

96. Restrepo, A., G. Benard, C. C. de Castro, C. A. Agudelo and A. M. Tobon (2008). "Pulmonary paracoccidioidomycosis." Semin Respir Crit Care Med **29**(2): 182-197.
97. Restrepo, A., J. G. McEwen and E. Castaneda (2001). "The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle?" Med Mycol **39**: 233-241.
98. Restrepo, A. and L. H. Moncada (1974). "Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis." Appl Microbiol **28**(1): 138-144.
99. Restrepo, A., D. A. Stevens, E. Leiderman, J. Fuentes, A. Arana, R. Angel, G. Mejia and I. Gomez (1980). "Ketoconazole in paracoccidioidomycosis: efficacy of prolonged oral therapy." Mycopathologia **72**(1): 35-45.
100. Restrepo, A. V., B. E. Salazar, M. Agudelo, C. A. Rodriguez, A. F. Zuluaga and O. Vesga (2005). "Optimization of culture conditions to obtain maximal growth of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*." BMC Microbiol **5**: 34.
101. Roilides, E., C. Blake, A. Holmes, P. A. Pizzo and T. J. Walsh (1996). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma prevent dexamethasone-induced immunosuppression of antifungal monocyte activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae." J Med Vet Mycol **34**(1): 63-69.
102. Romano, C. C., M. J. Mendes-Giannini, A. J. Duarte and G. Benard (2002). "IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients." Cytokine **18**(3): 149-157.
103. Sadek, M. I., E. Sada, Z. Toossi, S. K. Schwander and E. A. Rich (1998). "Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis." Am J Respir Cell Mol Biol **19**(3): 513-521.
104. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-1118.
105. Salomon, B., J. L. Cohen, C. Masurier and D. Klatzmann (1998). "Three populations of mouse lymph node dendritic cells with different origins and dynamics." J Immunol **160**(2): 708-717.
106. San-Blas, G. (1993). "Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*." J Med Vet Mycol **31**(2): 99-113.

107. San-Blas, G., G. Nino-Vega and T. Iturriaga (2002). "Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics." Med Mycol **40**(3): 225-242.
108. San-Blas, G. and F. San-Blas (1977). "Paracoccidioides brasiliensis: cell wall structure and virulence. A review." Mycopathologia **62**(2): 77-86.
109. San-Blas, G., F. San-Blas, F. Gil, L. Marino and R. Apitz-Castro (1989). "Inhibition of growth of the dimorphic fungus Paracoccidioides brasiliensis by ajoene." Antimicrob Agents Chemother **33**(9): 1641-1644.
110. Sandberg, K., M. L. Eloranta, A. E. Gobl and G. V. Alm (1991). "Phorbol ester-mediated inhibition of IFN-alpha/beta gene transcription in blood mononuclear leukocytes." J Immunol **147**(9): 3116-3121.
111. Sandberg, K., M. L. Eloranta, A. Johannisson and G. V. Alm (1991). "Flow cytometric analysis of natural interferon-alpha producing cells." Scand J Immunol **34**(5): 565-576.
112. Shankar, J., A. Restrepo, K. V. Clemons and D. A. Stevens (2011). "Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis." Clin Microbiol Rev **24**(2): 296-313.
113. Shikanai-Yasuda, M. A., Q. Telles Filho Fde, R. P. Mendes, A. L. Colombo and M. L. Moretti (2006). "[Guidelines in paracoccidioidomycosis]." Rev Soc Bras Med Trop **39**(3): 297-310.
114. Shortman, K. and W. R. Heath (2010). "The CD8+ dendritic cell subset." Immunol Rev **234**(1): 18-31.
115. Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-161.
116. Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.
117. Silva, L. B. R., L. S. Dias, G. M. G. Rittner, J. E. Munoz, A. C. O. Souza, J. D. Nosanchuk, L. R. Travassos and C. P. Taborda (2017). "Dendritic Cells Primed with Paracoccidioides brasiliensis Peptide P10 Are Therapeutic in Immunosuppressed Mice with Paracoccidioidomycosis." Front Microbiol **8**: 1057.
118. Silva-Vergara, M. L., R. Martinez, Z. P. Camargo, M. H. Malta, C. M. Maffei and J. B. Chadu (2000). "Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from armadillos (Dasypus novemcinctus) in an area where the fungus was recently isolated from soil." Med Mycol **38**(3): 193-199.

119. Silvana dos Santos, S., K. S. Ferreira and S. R. Almeida (2011). "Paracoccidioides brasiliensis-induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes." PLoS One **6**(5): e19690.
120. Siqueira, K. Z., A. M. Campos Soares, L. A. Dias-Melicio, S. A. Calvi and M. T. Peracoli (2009). "Interleukin-6 treatment enhances human monocyte permissiveness for Paracoccidioides brasiliensis growth by modulating cytokine production." Med Mycol **47**(3): 259-267.
121. Souto, J. T., F. Figueiredo, A. Furlanetto, K. Pfeffer, M. A. Rossi and J. S. Silva (2000). "Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to Paracoccidioides brasiliensis infection in mice." Am J Pathol **156**(5): 1811-1820.
122. Steinman, R. M. (2012). "Decisions about dendritic cells: past, present, and future." Annu Rev Immunol **30**: 1-22.
123. Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-1162.
124. Stover, E. P., G. Schar, K. V. Clemons, D. A. Stevens and D. Feldman (1986). "Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of Paracoccidioides brasiliensis." Infect Immun **51**(1): 199-203.
125. Taborda, C. P. and Z. P. Camargo (1994). "Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43." J Clin Microbiol **32**(2): 554-556.
126. Taborda, C. P. C. P., Rivera, J., Zaragoza, O., and Casadevall, A. (2003). More is not necessarily better: prozone-like effects in passive immunization with IgG. *J. Immunol.* **170**, 3621–3630.
127. Taborda, C. P., M. A. Juliano, R. Puccia, M. Franco and L. R. Travassos (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**(2): 786-793.
128. Taborda CP, Nosanchuk JD. Editorial: Vaccines, Immunotherapy and New Antifungal Therapy against Fungi: Updates in the New Frontier. *Front Microbiol.* 2017 Sep 8;8:1743
129. Teixeira Mde, M., R. C. Theodoro, F. F. Oliveira, G. C. Machado, R. C. Hahn, E. Bagagli, G. San-Blas and M. S. Soares Felipe (2014). "Paracoccidioides lutzii sp. nov.: biological and clinical implications." Med Mycol **52**(1): 19-28.

130. Tobon, A. M., C. A. Agudelo, M. L. Osorio, D. L. Alvarez, M. Arango, L. E. Cano and A. Restrepo (2003). "Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after itraconazole therapy." Clin Infect Dis **37**(7): 898-904.
131. Travassos, L. R., and Taborda, C. P. (2017). Linear epitopes of *Paracoccidioides brasiliensis* and other fungal agents of human systemic mycoses as vaccine candidates. Front. Immunol. 8:224.
132. TREJO-CHAVEZ, A. R.-R., R.; ANCER-RODRIGUEZ, J.; and A. M. R.-T. NEVAREZ-GARZA, L. E. (2011). "Disseminated Paracoccidioidomycosis in a Southern Two-Toed Sloth (*Choloepus didactylus*)". J.Comp. Path 144: 231-234
133. Turissini, D. A., O. M. Gomez, M. M. Teixeira, J. G. McEwen and D. R. Matute (2017). "Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*." Fungal Genet Biol **106**: 9-25.
134. Untereiner, W. A., J. A. Scott, F. A. Naveau, L. Sigler, J. Bachewich and A. Angus (2004). "The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales." Mycologia **96**(4): 812-821.
135. Valera, E. T., B. M. Mori, E. E. Engel, I. S. Costa, D. F. Brandao, M. H. Nogueira-Barbosa, R. G. Queiroz, S. Silveira Vda, C. A. Scrideli and L. G. Tone (2008). "Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking bone tumor." Pediatr Blood Cancer **50**(6): 1284-1286.
136. Vieira Gde, D., C. Alves Tda, S. M. Lima, L. M. Camargo and C. M. Sousa (2014). "Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease." Rev Soc Bras Med Trop **47**(1): 63-68.
137. Villadangos, J. A. and P. Schnorrer (2007). "Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo." Nat Rev Immunol **7**(7): 543-555.
138. Vremec, D. (2016). "The Isolation and Enrichment of Large Numbers of Highly Purified Mouse Spleen Dendritic Cell Populations and Their In Vitro Equivalents." Methods Mol Biol **1423**: 61-87.
139. Vremec, D. and K. Shortman (1997). "Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes." J Immunol **159**(2): 565-573.
140. Wanke, T., M. Merkle, D. Formanek, U. Zifko, G. Wieselthaler, H. Zwick, W. Klepetko and O. C. Burghuber (1994). "Effect of lung transplantation on diaphragmatic

function in patients with chronic obstructive pulmonary disease." Thorax **49**(5): 459-464.

141. Wilson, N. S., L. J. Young, F. Kupresanin, S. H. Naik, D. Vremec, W. R. Heath, S. Akira, K. Shortman, J. Boyle, E. Maraskovsky, G. T. Belz and J. A. Villadangos (2008). "Normal proportion and expression of maturation markers in migratory dendritic cells in the absence of germs or Toll-like receptor signaling." Immunol Cell Biol **86**(2): 200-205.

142. Worbs T, Hammerschmidt SI, Förster R. (2016). Dendritic cell migration in health and disease." Nat Rev Immunol. 2017 Jan;17(1):30-48.

143. Zhou, Q., T. Desta, M. Fenton, D. T. Graves and S. Amar (2005). "Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its lipopolysaccharide, or its FimA protein." Infect Immun **73**(2): 935-943.