THOR ANDREAS SILVA DI SESSA

**Terapia gênica na paracoccidiodomicose experimental
utilizando vetores de expressão de HSP60 e mL-12**

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

São Paulo

2013

THOR ANDREAS SILVA DI SESSA

**Terapia gênica na paracoccidiodomicose experimental
utilizando vetor de expressão de HSP60 e mL-12**

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

(versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de
2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2013

AOS MEUS PAIS, COSTABILE GIOVANI E LENÍCIA, QUE ME APOIARAM NA DECISÃO DE VIR A SÃO PAULO PARA ESTUDAR E PELO SUPORTE MORAL E AFETUOSO NAS HORAS DIFÍCEIS E IMPROVÁVEIS. AO MEU IRMÃO, COSTABILE, QUE ME AJUDOU E AINDA AJUDA NOS MAIS DIVERSOS ASSUNTOS. A MINHA CUNHADA E AO MEU LINDO SOBRINHO E AOS MEUS FAMILIARES DE SÃO PAULO, TIA TÔNIA, BRUNO, LUANA E MEU QUERIDO NONNO, POR TEREM ME HOSPEDADO E CUIDADO DE MIM DURANTE TODOS ESSES ANOS.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda por ter me recebido tão bem e ter sido uma pessoa maravilhosa ao longo desses cinco anos. A doutora Gilda Del Negro por ter cedido às instalações do Laboratório de Investigações Médicas 53 (LIM-53) para diversos experimentos e por ter me apoiado e aconselhado nas horas difíceis tanto no laboratório quanto em assuntos pessoais. A pesquisadora Glauce M. Rittner pela paciência por ter me ensinado tanto em tão pouco tempo.

Aos Professores (as), Benedito Corrêa, Luis Carlos Ferreira, Elaine G. Rodrigues, Maria Aparecida Shikanai Yasuda, Gil Benard, Sandro Rogério de Almeida e Gilda Del Negro pelas importantes colaborações e a todos os professores do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo e funcionários do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A todos os colegas e amigos do laboratório, Márcia Pinto da Silva, Felipe Augusto, Oriana M. Nader, Diego Rossi, Leandro Buffoni, Martha Urán, Glauce M. G. Rittner, Lucas Dias, Adriana Menezes, Fernanda Dias, Renata Amélia, Luciana Thomaz, Adriana Magalhães, Juliana de Amorim, Elúzia, Inarei Junior, Cleison Taira, Paula Barbarian, Vinicius D. Luft, a técnica Shirlei A. Vieira Marques, Dona Antônia, Aline, Dulce Figueiredo, Mônica Vidal, Aliete, Renata Buccheri De Oliveira, Antônio, Viviane, Roseli, Letícia, Glória, Mauro e Edna.

"All stand together for the world to see
Now the time is right to live out all our dreams
Say the words forever your strength will never leave
If you want to win the fight say **I BELIEVE**"

Manowar – I Believe

Don't get set into one form, adapt it and build your own, and let it grow, be like water. Empty your mind, be formless, shapeless — like water. Now you put water in a cup, it becomes the cup; You put water into a bottle it becomes the bottle; You put it in a teapot it becomes the teapot. Now water can flow or it can crash. Be water, my friend.

Bruce Lee

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas vigentes no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Paracoccidioidomicose (PCM) e <i>Paracoccidioides</i> spp.....	1
1.2. Paracoccidioidomicose.....	3
1.3. Resposta Imune na PCM	5
1.4. Glicoproteína de 43 kDa (gp43) e Peptídeo P10.....	8
1.5. Proteínas de choque térmico (HSPs).....	11
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo Geral	24
3.2. Objetivos Específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.2 Obtenção de cDNA por transcrição reversa.....	25
4.3 Tratamento das amostras com enzima de restrição	27
4.4 Ligação dos fragmentos de PCR ao vetor pcDNA3	28
4.5 Preparo das amostras bacterianas eletrocompetentes	28
4.6 Eletroporação.....	29
4.7 Confirmação dos clones purificados por seqüenciamento	29
4.8 Purificação de DNA plasmidial com vetor.	32
4.9 Cultivo do fungo e Preparo do Inoculo	34
4.10 Determinação da viabilidade	35
4.11 Animais	35
4.12 Infecção Intratraqueal.....	36
4.13 Esquema de Imunização.....	36
4.14 Determinação da carga fúngica nos pulmões dos camundongos BALB/c	38
4.15 Caracterização das citocinas: ELISA para a quantificação de IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-23 IFN- γ e TNF- α	38
4.16 Histologia	40
4.17 Análise estatística	40
5 RESULTADOS	41

5.1	Sequenciamento de amostra com inserto de HSP60, com iniciadores B e C.	41
5.2	Seqüenciamento de amostra com inserto de mIL-12, com iniciador PCRIL12F	45
5.3	Seqüenciamento do vetor pcDNA3 com iniciador SEQDNA3F	45
5.4	Ensaio de infecção com <i>P. brasiliensis</i> e posterior tratamento com vetores de interesse em camundongos BALB/c.	47
5.5	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias a partir de macerado de pulmão, fígado e baço.....	48
5.6	Quantificação de citocinas pelo método ELISA após o sacrifício dos camundongos BALB/c.....	52
5.6.1.	Quantificação de IFN- γ e IL-12	52
5.6.2.	Quantificação de IL-10 e IL-4.....	55
5.6.3.	Quantificação de TNF- α	58
5.6.4.	Quantificação de IL-1 β	60
5.6.5.	Quantificação de IL-17 e 23.....	62
5.6.6.	Quantificação de IL-6.....	65
5.7	Histologia do pulmão de camundongos BALB/c infectados e tratados com vetores de interesse por quatro semanas e posteriormente sacrificados com 60 dias de infecção.	67
6	DISCUSSÃO.....	70
7	CONCLUSÕES.....	78
8	ANEXO A.....	79
9	REFERÊNCIAS	80

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ATP *Adenosine Triphosphate*

BHI *Brain Heart Infusion* (infusão de cérebro e coração)

CD *Cluster of differentiation*

CO₂ Dióxido de carbono

DNA Ácido desoxirribonucleico

ELISA *Enzyne Linked Immuno Sorbent Assay*

g Força de centrifugação

g Gramas

gp43 Glicoproteína de 43 kDa

HSP *Heat Shock Protein* (Proteína de Choque Térmico)

HSP60 *Heat Shock Protein of 60 kDa* (Proteína de Choque Térmico de 60 kDa)

HSP70 *Heat Shock Protein of 70 kDa* (Proteína de Choque Térmico de 70 kDa)

HTT Hipersensibilidade Tipo Tardio

i.t. Intratraqueal

IFN- γ Interferon-gama

IgG1 Imunoglobulina G isotipo 1

IgG2a Imunoglobulina G isotipo 2a

IL-10 Interleucina 10

IL-12 Interleucina 12

IL-17 Interleucina 17

IL-1 β interleucina 1 beta

IL-23 Interleucina 23

IL-4 Interleucina 4

IL-5 Interleucina 5

IL-6 Interleucina 6

IU *International Unit*

Kb Kilobase

kDa Kilodalton

Kg Kilogramas

LPS Lipopolissacarídeo

M Molar

mg Miligramas

MHC *Major Histocompatibility Complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)

mIL-12 Interleucina 12 murina

ml Mililitros

mM Mili Molar

ng Nanograma

nm Nanômetro

O.N Over Night

°C Graus Celsius

P10 Peptídeo 10

Pb 18 *Paracoccidioides brasiliensis* isolado 18

PbHSP60 Proteína de Choque térmico de *P. brasiliensis*

PbHSP60 Proteína de choque térmico de 60 kDa de *P. brasiliensis*

PBS *Phosphate buffered saline*

PCM Paracoccidioidomicose

pH Potencial Hidrogeniônico

rIL-12 Interleucina 12 recombinante

RNA Ácido ribonucleico

rpm Rotações por minuto

SPF Specific Pathogen Free,

TCD4+ Linfócito T CD4⁺

TCD8+ Linfócito T CD8⁺

TGF- β *Transforming Growth Factor-beta*

Th1 Linfócito T *helper* 1

Th2 Linfócito T *helper* 2

Th17 Linfócito T *helper* 17

TLR *Toll Like Receptor*

TNF- α Fator de necrose tumoral-alfa

Treg Linfócito T Regulador

UFC Unidades formadoras de colônias

μ g Microgramas

μ l Microlitros

RESUMO

Di Sessa TAS. Terapia gênica na paracoccidioidomicose experimental utilizando vetor de expressão de HSP60 e mIL-12 [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença sistêmica de caráter granulomatoso, causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides* spp. A PCM é endêmica na América Latina e aproximadamente 80% dos pacientes vivem no território brasileiro. O tratamento medicamentoso é eficiente, entretanto, é longo e vários pacientes acabam abandonando e recidivas são comuns neste grupo. A utilização de uma vacina terapêutica poderia resultar na redução do tempo de tratamento assim como, recuperar a resposta imune do hospedeiro frente ao fungo. As vacinas de DNA são uma abordagem promissora na imunoterapia e podem ser injetadas por via intramuscular, intradérmica ou via mucosa. As proteínas de choque térmico (HSPs) são proteínas que estão ligadas a homeostase celular e também possuem efeitos imunológicos em diversos casos como doenças infecciosas e autoimunes. No presente trabalho, analisamos o esquema vacinal terapêutico em camundongos BALB/c previamente infectados intratraquealmente com 3×10^5 leveduras de *P. brasiliensis* Pb18, 60 dias depois, submetidos a imunização com pcDNA₃ contendo sequências codificadoras de *PbHSP60* e/ou IL-12 murina e/ou vetor vazio. Foi observada redução significativa no número de unidades formadoras de colônia (UFCs) nos pulmões de camundongos imunizados com *PbHSP60*. Os grupos que receberam *PbHSP60*+pcDNA₃

vazio ou *PbHSP60x2* apresentaram os maiores índices de redução da cargas fúngicas. A inclusão do plasmídeo contendo o inserto de mL-12, resultou em um efeito deletério. A análise dos cortes histológicos indicou que os animais vacinados apresentavam áreas bem preservadas e com poucos ou nenhum foco de granuloma. Detectamos um perfil de citocinas típico Th1/Th2. Nossos resultados sugerem que a imunização utilizando plasmídeo contendo o inserto HSP60, tem grande potencial vacinal.

Descritores: Paracoccidioides, Chaperonina 60, Terapia Gênica, Homeostase Vacinas/Administração & Dosagem, Camundongos Endogâmicos BALB/c

ABSTRACT

Di Sessa TAS. Gene therapy in experimental paracoccidioidomycosis using HSP60 expression vector and mIL-12 [Dissertation]. . São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

The paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease of character, caused by the thermally dimorphic fungus *Paracoccidioides* spp. The PCM is endemic in Latin America and approximately 80% of patients are living in Brazil. The medical treatment is effective, however, is long and many patients end up abandoning and relapses are common in this group. The use of a therapeutic vaccine could result in the reducing time of treatment as well as recover the host immune response against the fungus. DNA vaccines are a promising approach for immunotherapy and can be injected by intramuscular, intradermal, or mucosal route. The heat shock proteins (HSPs) are proteins that are linked to cellular homeostasis and also have immunological effects in many cases as infectious and autoimmune diseases. In the present study, we analyzed the therapeutic vaccine schedule in BALB/c mice previously infected intratracheally with 3×10^5 yeast of *P. brasiliensis* strain 18, and 60 days after, undergoing immunization with pcDNA₃ containing coding sequences *PbHSP60* and / or murine IL-12 and / or empty vector. Significant reduction was observed in the number of colony forming units (CFU) in the lungs of mice immunized with *PbHSP60*. The groups that received empty pcDNA₃ and *PbHSP60* or *PbHSP60x2* have higher rates of reduced fungal loads. The inclusion of the plasmid containing the insert mIL-12 resulted in a deleterious effect. The analysis of histological sections indicated that vaccinated animals had well-

preserved, with few or no focus of granuloma areas. It was detected a profile typical Th1/Th2 cytokines. Our results suggest that immunization using plasmid containing the insert HSP60 vaccine has great potential.

Descriptors: Paracoccidioides; Chaperonin 60; Gene Therapy;
Homeostasis; Vaccines / administration & dosage; Mice, Inbred BALB / c

1. INTRODUÇÃO

1.1. Paracoccidioidomicose (PCM) e *Paracoccidioides* spp.

O fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), doença sistêmica, crônica, que acomete principalmente o tecido pulmonar, sistema linfático, fígado e baço. Foi descrita primeiramente por Adolpho Lutz, em 1908 ao examinar pacientes com lesões bucais. Inicialmente denominada de Blastomicose Sul-Americana ou Doença de Lutz-Splendore e Almeida (Lacaz 1994), a doença teve seu nome oficializado em 1971, na Colômbia, durante a reunião de Micologistas da América do Sul, para Paracoccidioidomicose (Lacaz 1994).

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo que apresenta dimorfismo térmico. Na forma miceliana, que representa provavelmente a forma infectante, cresce entre 18°C a 25°C. Quando está presente em tecidos assume a forma de levedura que se desenvolve a 37°C sendo responsável pelo estabelecimento da infecção. (Franco, Montenegro *et al.* 1987; San-Blas 1993).

Em estudos recentes, baseado em análises de variabilidade genética, foi proposta a existência de 3 grupos filogenéticos distintos, sendo eles: S1 - grupo parafilético com 38 isolados da Argentina, Brasil, Peru e Venezuela e 1 isolado de pinguim da Antártida; PS2 - grupo monofilético com 6 isolados, sendo 5 do Brasil e 1 da Venezuela; PS3 - grupo monofilético com 21 isolados da Colômbia (Teixeira, Theodoro *et al.* 2009). Posteriormente, sete outros isolados que não estavam presentes nos estudos anteriores, foram analisados e agrupados nos clados S1 e PS3, porém, o isolado Pb01 ficou separado dos

outros grupos, na base do cladograma(Desjardins, Champion *et al.* 2011). Estima-se que o grupo monofilético Pb01-like foi separado dos grupos S1, PS2 e PS3 a aproximadamente 30 milhões de anos atrás. Baseados nestes dados, foi proposta uma nova classificação para os isolados Pb01-like, colocando-os como uma nova espécie dentro do gênero, denominada *Paracoccidioides lutzii*. O grupo Pb01-like é endêmico nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil (Rondônia, Mato Grosso e Goiás) e compartilha algumas áreas geográficas com o grupo S1 (Teixeira, Theodoro *et al.* 2013).

Não se sabe ao certo qual o reservatório natural do fungo. Com o passar dos anos, pesquisadores conseguiram isolar amostras do fungo em diferentes solos como Venezuela (De Albornoz 1971), Argentina (Negroni 1968) e em estados brasileiros como Minas Gerais (Silva-Vergara, Martinez *et al.* 1998) e Pará (Naiff, Ferreira *et al.* 1986). Há relatos de isolamentos em animais como tatus (Bagagli, Sano *et al.* 1998), morcegos (Grose and Tamsitt 1965) e até em ração de cachorro (Ferreira, Freitas *et al.* 1990). Estas amostras foram coletadas em ambientes elevados, próximos a rios e outros corpos d'água. Mas a principal característica para o crescimento do fungo parece ser a temperatura ótima de 18°C a 24°C (Restrepo-Moreno 1994).

A principal forma de infecção por *Paracoccidioides* spp. é através das vias respiratórias pela inalação dos propágulos fúngicos, que alcançam a arquitetura pulmonar e se transformam em estruturas leveduriformes no tecido (Franco 1987). As atividades relacionadas com agricultura, jardinagem e outras, estão intimamente relacionadas com os casos da doença, sendo assim, consideradas atividades de risco devido à maioria dos doentes relatar ter tido algum tipo de contato com estas atividades, em certos momentos de sua vida.

Este fato representa um grande problema na saúde pública, já que o alto grau de incapacitação e, as vezes, morte, leva o indivíduo a parar em sua fase produtiva da vida, causando assim, um impacto tanto social como econômico (Shikanai-Yasuda, Telles Filho Fde *et al.* 2006).

1.2. Paracoccidioidomicose

A Paracoccidioidomicose (PCM) apresenta-se, geralmente, sob duas formas distintas: A forma aguda ou subaguda que é responsável por 3 a 4% dos casos e caracteriza-se por rápida disseminação para o sistema retículo-endotelial e a forma crônica que pode apresentar-se como unifocal ou multifocal. A doença, na sua forma crônica, progride lentamente, podendo levar de meses a anos para se tornar aparente sendo as manifestações pulmonares, presentes em até 90% dos casos (Brummer, Castaneda *et al.* 1993). Na forma unifocal, em 25% dos casos, os pulmões e, raramente, outros locais são os únicos órgãos envolvidos (Londero 1990). Na forma multifocal, além dos pulmões, os principais sítios envolvidos são mucosa oral, pele, linfonodos e glândulas adrenais e, em menor grau de frequência, sistema nervoso central, ossos, órgãos genitais e vasos sanguíneos.

A PCM, raramente, é observada em crianças e jovens, sendo mais incidente em homens com idade entre 30 e 50 anos. A mulher está mais protegida da doença, devido à presença de estrógenos endógenos que atuam através de proteínas ligantes no citosol dos fungos, inibindo a transformação de micélio em levedura (Stover, Schar *et al.* 1986; Aristizabal, Clemons *et al.* 2002).

Existem hoje diversos métodos para o diagnóstico da PCM. O mais comumente utilizado ainda é a cultura e a identificação de elementos fúngicos de *P. brasiliensis*/*P. lutzii* em exame a fresco de espécimes clínicos, como biópsia de tecido ou escarro. Alguns testes sorológicos como ensaios imunoenzimáticos, imunodifusão dupla e contra-imunoeletroforese podem ser empregados tanto como auxílio ao diagnóstico em casos onde o fungo não é facilmente visualizado, quanto no acompanhamento clínico/laboratorial dos pacientes.(Shikanai-Yasuda, Telles Filho Fde *et al.* 2006; Wanke and Aide 2009).

O desenvolvimento da doença no homem pode ser imediata ou demorar anos, já que o fungo tem a capacidade de se manter em um estado de quiescência no pulmão do indivíduo por tempo indeterminado (Restrepo, de Bedout *et al.* 1981). A doença pode ficar contida nos pulmões ou se disseminar para outros órgãos ou sistemas, pela via linfática e/ou hematogênica, causando assim lesões secundárias (Franco 1987). Há uma gama de fatores que contribuem para o estabelecimento, da doença como, virulência do fungo, composição antigênica e aptidão do sistema imune do indivíduo. Os pacientes com a forma grave da doença apresentam altos títulos de anticorpos não protetores, e normalmente, resposta imune celular deficiente contra antígenos do fungo. Já os pacientes com a forma mais branda da doença, possuem uma resposta imune celular adequada e baixos níveis de anticorpos, conseguindo assim eliminar a infecção (Franco 1982; Franco, Sano *et al.* 1989).

1.3. Resposta Imune na PCM

Estudos experimentais (Castaneda, Brummer *et al.* 1987) e clínicos (Camargo, Baruzzi *et al.* 1998) indicaram a relevância das respostas celular e humoral na patogenicidade e evolução da PCM. Indivíduos infectados com PCM apresentam desequilíbrio em relação a imunidade celular, caracterizada por uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia prejudicada e alteração da relação $CD4^+/CD8^+$ (Arango and Yarzabal 1982).

Como a primeira linha de resposta na PCM humana ocorre principalmente nos pulmões, há a secreção de muitas moléculas antimicrobianas e outras responsáveis pelo recrutamento e ativação dos macrófagos alveolares residentes neste microambiente. Como a PCM é uma doença que não é diagnosticada logo após a infecção inicial, os estudos se concentram em respostas tardias, como resposta humoral e celular (Calich, da Costa *et al.* 2008).

A resposta mediada por células Th_1 , responsável pela liberação das citocinas como IL-12 e IFN- γ é considerada a principal resposta protetora contra doenças fúngicas. Outras citocinas e rotas diferentes de ativação de células T também são importantes e estão, aos poucos, atraindo a atenção de pesquisadores, como é o caso das células T reguladoras e as células da resposta $Th17$ (Romani 2008).

Na PCM, a geração de uma resposta polarizada para Th_1 , mediada por IL-12, é de extrema importância contra infecções fúngicas. Uma resposta tecidual efetiva contra invasões fúngicas e a formação de granulomas, são importantes etapas na contenção dos fungos. As citocinas pró-inflamatórias

produzidas por estas células tem ação citotóxica e podem induzir reações de hipersensibilidade do tipo tardia (HTT). Portanto, estas células são extremamente importantes para a ativação correta de células especializadas no sítio de infecção, elevando assim, as chances de controle da doença (Mosmann and Sad 1996; Romani 2004).

Com o objetivo de estudar as diferenças entre as duas principais formas clínicas da PCM do ponto de vista imunológico, um modelo experimental foi proposto, baseado em linhagens murinas geneticamente resistentes ou suscetíveis. Neste modelo, proposto por CALICH e colaboradores (1985) (Calich, Singer-Vermes *et al.* 1985), camundongos da linhagem B10.A mostraram-se suscetíveis à infecção por *P. brasiliensis* e, portanto, correspondem, no modelo humano, à forma aguda, severa da doença. Já os camundongos A/Sn ou A/J são considerados resistentes e representam a forma crônica. Através da utilização deste modelo, verificou-se que a resistência à PCM está relacionada a uma resposta imune celular predominante, com a ativação de macrófagos, os quais secretam baixas quantidades de IL-12 e altos níveis de TGF- β , levando, em um primeiro momento, a um menor controle da carga fúngica. Contudo, de forma progressiva, ocorre a ativação de células T CD4⁺, as quais ativam os macrófagos que então serão capazes de controlar a inflamação e levar a uma regressão da doença, com a presença de lesões organizadas, os granulomas.

Para promover uma importante ligação entre a imunidade inata com a adaptativa, muitos grupos de investigadores tentaram elucidar o papel da IL-12, uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por células fagocitárias (Trinchieri 1995). Esta citocina é de extrema importância para o

desenvolvimento da resposta Th₁ contra agente fúngicos. Ao tratar camundongos com IL-12 em uma infecção por *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* ou *Coccidioides immitis* os animais foram protegidos pela modulação imune induzida pela citocina. A neutralização dessa citocina em animais suscetíveis ou resistentes, promoveu o agravamento da PCM pulmonar (Kawakami, Tohyama *et al.* 1996; Jiang, Magee *et al.* 1999).

Já a suscetibilidade à PCM, caracteriza-se por uma resposta imune celular ineficiente, com ativação, principalmente, de células B e presença de lesões não organizadas ou frouxas. Os macrófagos alveolares e células dendríticas destes animais são capazes de secretar IL-12, IFN- γ e produzir óxido nítrico, o que leva a uma eficácia inicial no combate ao fungo. Porém, ao que parece, a produção exagerada de óxido nítrico leva a um estado de anergia de células T CD4⁺, levando a uma resposta pouco eficiente. Desta forma, estabeleceu-se uma dicotomia da resposta imune na paracoccidioidomicose, tendo-se de um lado a resposta imune celular do tipo Th₁ associado à resistência e de outro lado, a resposta imune celular do tipo Th₂ associado à suscetibilidade à doença (Calich and Kashino 1998; Arruda, Franco *et al.* 2002; Calich, da Costa *et al.* 2008). Tal dicotomia pode ser comprovada, analisando-se o perfil das citocinas secretadas pelos camundongos suscetíveis e resistentes à PCM, sendo que os animais suscetíveis secretam níveis muito baixos das citocinas associadas ao padrão Th₁ da resposta imune, como IFN- γ e IL-12, contrariamente ao que ocorre com os camundongos resistentes, os quais secretam níveis elevados e constantes destas citocinas (Kashino, Fazioli *et al.* 2000).

1.4. Glicoproteína de 43 kDa (gp43) e Peptídeo P10

Diante da importância da PCM, a busca de antígenos específicos do fungo tornou-se também relevante. Em 1986, Puccia e colaboradores, analisando componentes extracelulares liberados pela fase leveduriforme do fungo, conseguiram identificar uma glicoproteína com massa molecular de 43.000 daltons, denominada de gp43, a qual, dentre outras glicoproteínas identificadas, foi caracterizada como antígeno específico de *P. brasiliensis*, uma vez que é reconhecida por praticamente todos os soros de pacientes com paracoccidioidomicose, sendo inclusive utilizada atualmente principal antígeno para o diagnóstico sorológico desta micose. Uma vez que a gp43 é capaz de elicitar uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio, Taborda e colaboradores, em 1998, buscaram identificar epitopos que tivessem potencial para serem utilizados na terapia da paracoccidioidomicose. Desta forma, foi identificado um epítipo de células T, o peptídeo de 15 aminoácidos denominado P10. Este peptídeo é capaz de conferir proteção a camundongos BALB/c frente a um desafio com *P. brasiliensis* de forma mais eficaz do que a gp43, uma vez que elicita uma resposta imune celular do tipo Th₁, considerada protetora na infecção (Taborda, Juliano *et al.* 1998). Este peptídeo, quando associado às drogas comumente utilizadas no tratamento da paracoccidioidomicose, apresenta um efeito aditivo em modelo experimental, utilizando camundongos BALB/c, o que demonstra uma capacidade do peptídeo P10 em auxiliar na diminuição do tempo de tratamento desta micose (Marques, da Silva *et al.* 2006).

Além da gp43, outros antígenos de *P. brasiliensis* foram purificados por cromatografia de troca iônica e exerceram propriedades protetoras. Duas frações, chamadas de F0 e FII, provaram serem protetores em camundongos, uma vez que a fração FIII exacerbou a doença (Diniz, Cisalpino *et al.* 1999). A imunização de camundongos com as frações F0 e FII, que são componentes de superfície, conseguiu conter as formas altamente virulentas de *P. brasiliensis*. Embora a fração FIII tenha induzido a produção de IFN- γ , essa propriedade não resultou em proteção contra o desafio intratraqueal (Diniz, Reis *et al.* 2004; Goes, Goes *et al.* 2005).

Em um protocolo vacinal usando células de *P. brasiliensis* que foram radio atenuadas, de Bastos Ascenco Soares *et al.*, (2008)(de Bastos Ascenco Soares, Gomez *et al.* 2008) conseguiram resultados animadores. Camundongos infectados com leveduras atenuadas por radiação dispararam uma resposta mista Th₁/Th₂ com prevalência de IFN- γ e TNF- α junto com níveis elevados de IL-5 e IgG1 mas com baixa produção de IgG2a em protocolo de 30 dias pós infecção. Mas, em protocolo de 90 dias pós infecção, a presença de TNF- α associado com altos níveis de IFN- γ sem a presença de IL-5 e IL-10, paralela com a baixa produção de IgG2a em todos os grupos, sugeriam a indicação de um padrão Th₁ dominante. Um comportamento similar foi observado em camundongos imunizados com peptídeos derivados da gp43 como adjuvante na quimioterapia (Marques, da Silva *et al.* 2006).

Com os resultados promissores obtidos utilizando-se o peptídeo P10 como adjuvante à quimioterapia na PCM experimental, o seu potencial como composto vacinal foi explorado. RITTNER *et al.*, (2012)(Rittner, Munoz *et al.* 2012) inseriram, em um vetor plasmidial, a seqüência de DNA, para expressão

do peptídeo P10. Esta construção mostrou-se bastante eficaz tanto em modelo experimental terapêutico quanto profilático, principalmente quando utilizada em conjunto com vetores expressando IL-12 murina, levando a uma diminuição significativa da carga fúngica nos pulmões dos animais do estudo. A utilização da terapia gênica no combate às infecções fúngicas apresenta vantagens, pois é capaz de ativar tanto linfócitos T CD8⁺, os quais apresentam importante papel no controle das infecções fúngicas, quanto linfócitos T CD4⁺ (Cutler, Deepe *et al.* 2007). Este tipo de vacina, conhecida como vacina de DNA, é composta de um plasmídeo contendo a sequência da proteína de interesse, uma origem de replicação bacteriana, um marcador para seleção, um promotor eucariótico e uma sequência de poliadenilação.

A origem de replicação de *Escherichia coli* é a mais indicada para que se obtenha plasmídios de alta cópia, facilitando o processo de extração deste DNA plasmidial e sua posterior purificação para uso terapêutico. Para os marcadores de seleção, os quais servem para selecionar o plasmídeo de interesse em uma cultura bacteriana, são utilizados geralmente genes de resistência a antibióticos como, por exemplo, a kanamicina. O promotor eucariótico deve ser um promotor forte para que se consiga uma expressão em células de mamíferos e os mais recomendados são os promotores derivados de vírus como o do *cytomegalovírus* (CMV) ou do *Simian virus 40* (SV40), pois foram os que apresentaram maior expressão do transgene (Garmory, Brown *et al.* 2003; Liu 2003). As vacinas de DNA podem ser injetadas via intramuscular, intradérmica ou via mucosa e assim que o plasmídeo entra no núcleo da célula do indivíduo tem início a transcrição do gene de interesse, culminando com a produção da proteína. Desta forma temos a rota de processamento antigênico

endógena, o que leva à ativação de linfócitos T CD8⁺ e a rota exógena, iniciada através de antígenos secretados pelas células transfectadas ou que estão morrendo, resultando na ativação de linfócitos T CD4⁺. No modelo de vacinação profilática, as células T são ativadas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). Já no modelo terapêutico, as células de memória podem sofrer um “boost”, principalmente no caso de infecções crônicas, como ocorre com a paracoccidiodomicose (Donnelly, Wahren *et al.* 2005; Cutler, Deepe *et al.* 2007).

1.5. Proteínas de choque térmico (HSPs)

O calor tem sido tradicionalmente usado em muitas culturas, por milênios para a cura de uma variedade de desordens. Como exemplo, temos um texto indiano antigo que descreve sobre literatura médica e nos revela a prática da fomentação, que é a aplicação de cataplasmas quentes como terapia contra a manifestação de doenças e a ‘perturbação do equilíbrio’. Quando há um desequilíbrio no corpo, cataplasmas são usados para restaurar as funções até o nível básico. Cataplasmas, ou choque por calor em linguagem atual, deve ser usada repetidamente no paciente para atingir um aquecimento crônico e assim restaurar as funções normais do local. A prática deve ser mantida até que haja uma recuperação completa de resfriados, dores abdominais, câibras entre outros. O suor e a maciez da pele são o ponto ótimo do tratamento, contudo, sensação de queimadura e sede são sintomas aparentes se a técnica for usada com excesso. Existem 13 tipos de cataplasmas, cada um com o seu respectivo propósito e resultado. Podem ser

direcionado para órgãos específicos e suas doenças, como o estômago, cólon e juntas. Em adição ao cataplasma, outras ferramentas para gerar calor incluem exercícios, repousar em saunas, vestir roupas pesadas, raiva, beber em excesso, medo, fúria, lutar e se expor ao sol (Charaka, 500 B.C, published 1957, Charaka Samhita. Motilal Banarasi Das Publisher, Allahabad)(Anderson and Srivastava 2000).

Os exemplos acima não devem ser seguidos como prática corriqueira, mas como uma ilustração da seriedade do uso do choque térmico como forma de terapia. Hoje em dia o calor continua sendo uma área importante de estudo. O interesse por pirógenos endógenos como IL-1 β (Hanson and Murphy 1984), TNF- α (Old 1985), IL-6 (Luheshi and Rothwell 1996) e hipertermia (Masso-Welch, Black *et al.* 1999) são algumas das linhas de pesquisa seguidas por pesquisadores.

Os mecanismos biológicos disparados pelo calor, a nível celular, tornaram-se um assunto de intensa investigação desde que técnico de laboratório ‘acidentalmente’ aumentou a temperatura de uma estufa em que se encontravam alguns espécimes de mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, a mais de 40 anos atrás (Ritossa 1962). Com isso, cromossomos das glândulas salivares presentes nestas moscas sofreram ação do choque térmico, e ativaram-se em *loci* específicos. Estes *loci* se tornaram nos anos subseqüentes, um terreno fértil para o estudo de resposta ao estresse, evolução e modelos transcripcionais. Estudos posteriores indicavam que estas Proteínas de Choque Térmico (Heat Shock Proteins - HSPs) representavam o grupo mais abundante de moléculas em seres vivos. Enquanto algumas HSPs podem ser expressas pelo choque térmico, falta de glucose e outros tipos de

stress, a maioria delas está presente em estados normais nas células (Lindquist and Craig 1988). Com o passar dos anos, a comunidade científica testemunhou evidências importantes em relação a biologia das HSPs e suas propriedades únicas, que permitem as mesmas gerarrem resposta imune específica contra agentes infecciosos, alguns tipos de câncer e até na resposta inata.

O termo proteínas de choque térmico, de certo modo, é errôneo, uma vez que, tal estado não é induzido apenas por calor. Contudo, em adição, por ser constitutivamente expressa, representando de 5 a 10% de todas as proteínas celulares em estado normal de crescimento, estas proteínas podem ser induzidas, cerca de 15% do peso total da célula, por uma ampla gama de insultos como exposição a agentes químicos, stress oxidativo, queda na temperatura, radiação ultravioleta, infecções virais e lesões por isquemia e reperfusão (Lindquist and Craig 1988; Welch 1993). Há ainda drogas que podem induzir a síntese de proteínas de choque térmico que são divididas em dois componentes. O primeiro são moléculas indutoras que ativam o fator de choque térmico (HSF) na falta de stress adicional e a segunda são os co-indutores que parcialmente induzem a ativação do HSF. Neste segundo caso é preciso um sinal de stress adicional para a completa ativação do HSF (Ohtsuka, Kawashima *et al.* 2005; Soti, Nagy *et al.* 2005).

Compostos como a geldanamicina inibem a síntese de HSP90 que a previnem de se ligar no HSF e assim atrasando a ação desta proteína (WHITESSELL *et al.*, 1994; ZOU *et al.*, 1998)(Whitesell, Mimnaugh *et al.* 1994; Zou, Guo *et al.* 1998). Drogas não esteróides anti-inflamatórias como o salicilato de sódio são consideradas como co-indutoras da expressão de HSP

(JURIVICH *et al.*, 1992). Há também ervas medicinal com efeitos similares, mas sem efeitos tóxicos usados por humanos. Algumas delas possuem efeitos anti-inflamatórios e até anticancerígenos (WESTERHEIDE *et al.*, 2004; YAN *et al.*, 2004; KATO *et al.* 1998)(Kato, Ito *et al.* 1998; Westerheide, Bosman *et al.* 2004; Yan, Saito *et al.* 2004).

Agentes estressantes que causam agregação protéica, desdobramento protéico, dobramento incompleto ou errôneo disparam uma resposta que leva a indução da transcrição de genes de proteínas com a capacidade de reestabilizar e reconfigurar tais proteínas e, assim, atingiem o balanço normal entre síntese, montagem e degradação destas moléculas.

A regulação do gene de transcrição da proteína de choque térmico é mediada pela interação do fator de transcrição do fator de choque térmico (HSF), que em mamíferos é designado como HSF1, com os elementos de choque térmico (do inglês HSE) nas regiões promotoras do gene de choque térmico (Voellmy 1994; Morimoto 1998). Em estado normal celular, HSF1 está presente no citoplasma celular em forma de molécula monomérica latente e é incapaz de se ligar ao DNA. Em condições de stress, HSF1 é então hiperfosforilado de uma maneira dependente de RAS por membros das subfamílias de quinases protéicas ativadas por mitógenos (MAPK) (Knauf, Newton *et al.* 1996; Kim, Nueda *et al.* 1997). HSF1 é então convertido em trímeros fosforilados com a capacidade de se ligar ao DNA e se transloca do citoplasma para o núcleo. O sinal que ativa o HSF1 é o fluxo de novas proteínas sintetizadas não ativas (Morimoto 1998).

A geração de proteínas de choque térmico deve ser transiente, mesmo que a exposição ao stress seja por períodos prolongados, pois a presença

contínua destas proteínas influenciaria na homeostase protéica e em uma variedade de funções celulares. Um mecanismo pelo qual a atividade HSF1 é regulada é via ligação da HSP70 com o seu domínio de transativação, levando assim, a uma repressão do gene de transcrição da proteína de choque térmico. A interação entre a HSP70 e o HSF1 não possui efeito na ligação ao DNA ou no estado de fosforilação induzida por stress da HSF1 (Shi, Mosser *et al.* 1998). Um segundo mecanismo que regula a síntese de proteínas de choque térmico é a interação entre o fator de ligação a proteína de choque térmico 1 (HSBP1) e a forma ativa trimérica da HSF1 que se liga ao DNA. HSBP1 é predominantemente localizada no núcleo celular e níveis de mRNA foram detectados em altas concentrações numa variedade de linhagens celulares de tecidos animais e não são afetadas por choque térmico (Satyal, Chen *et al.* 1998).

Segundo Cunha *et al.*, (2002)(Cunha, Zancoppe-Oliveira *et al.* 2002), as HSPs também desempenham um papel protetor conta doenças infecciosas (Macchia, Massone *et al.* 1993; Quijada, Requena *et al.* 1996).

Desde 1993, HSPs das famílias 60, 70, 90 e gp96 de uma variedade de fontes, incluindo preparações purificadas de bactérias (Skeen, Miller *et al.* 1996), de várias espécies de mamíferos (Friedland, Shattock *et al.* 1993) e especialmente de humanos (Kol, Sukhova *et al.* 1998; Dybdahl, Wahba *et al.* 2002) tem mostrado serem fortes ativadores do sistema imune inato (Wallin, Lundqvist *et al.* 2002). Essas preparações induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, liberação de óxido nítrico (NO) e quimiocinas do tipo C-C por monócitos, macrófagos e células dendríticas. Estas HSPs também induzem a maturação de células dendríticas como

demonstrado pela regulação positiva de MHC de classe I e II e moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86 (Basu, Binder *et al.* 2000; Somersan, Larsson *et al.* 2001).

Estes efeitos de citocinas que as HSPs apresentam quando comparadas com sua função de chaperona molecular e função de apresentação de antígenos, são únicas, pois elas não necessitam de associações com peptídeos, nem hidrólise de ATP ou co-fator e nenhuma montagem complexa de proteínas (Tsan and Gao 2004). Asea *et al.*, (2000)(Asea, Kabingu *et al.* 2000) cunharam o termo 'chaperocinas' para designar sua função dupla de chaperona e citocina. Os efeitos de citocinas induzidas por HSP foram demonstrados via receptores do tipo Toll, ambos TLR2 e TLR4, por via de transdução de sinal levando a ativação do fator nucleioide kB (NFkB) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), JNK (quinase terminal N c-JUN) e quinase p38 (Asea, Rehli *et al.* 2002; Bulut, Faure *et al.* 2002). Receptores do tipo Toll são receptores de reconhecimento de padrões envolvidos na imunidade inata, para a defesa do hospedeiro contra patógenos (Medzhitov 2001). Os receptores são proteínas transmembranas do tipo I com domínios extracelulares contendo repetições ricas em Leucinas e domínio citoplasmático análogo ao da família do receptor IL-1 (IL-1R). Uma proteína adaptadora chamada de MyD88 (proteína de diferenciação mielóide 88) se liga ao motivo homólogo do Toll/IL-1R (TIR) através de seu próprio motivo, enquanto um domínio de morte em seu C terminal recruta quinases associadas ao IL-1R (IRAK) ao complexo. IRAK é então autofosforilado e liberado do complexo para se ligar ao TRAF6 (receptor associado ao fator 6), que então ativa o NFkB e os MAPKs (Muzio, Natoli *et al.* 1998; Akira 2003). Junto com o

CD14 e a proteína acessória MD2, TLR4 inicia a sinalização em cascata de resposta ao LPS (Politorak, He *et al.* 1998; Akira 2003), uma vez que o TLR2 inicia a cascata de sinalização em resposta as lipoproteínas bacterianas e peptideoglicanos (Takeuchi, Hoshino *et al.* 1999).

Em células eucarióticas, a maioria das HSPs é encontrada em mitocôndrias. A expressão na superfície celular é maior em condições inflamatórias ou durante o processo de regeneração de tecidos (Soltys and Gupta 1996; Soltys and Gupta 1997). Tanto HSP60 mitocondriais como de superfície se tornam amplamente acessíveis durante o processo de necrose e faz com que haja uma grande estimulação local da resposta imune inata. HSP60 também pode ser liberada pelas células em forma solúvel e um aumento da expressão dessa proteína em fluídos peritoneais de mulheres com endometriose foi associado com citocinas pró-inflamatórias e macrófagos ativados (Kligman, Grifo *et al.* 1996).

Um estudo realizado no fim dos anos 80 provou que estas proteínas estavam presentes em culturas de células embrionárias de ratos. O tratamento destas células com calor aumentou o espectro de proteínas liberadas incluindo grandes quantidades de HSP70 e HSP110. Contudo, foi sugerido que a liberação destas proteínas fosse proveniente de mudanças no pH, aumento na tensão de gases, rompimento da camada de difusão na superfície celular ou stress mecânico oriundo da manipulação *in vitro*. A liberação destas proteínas parece não estar associado à via de secreção comumente usada, pois não houve bloqueio por inibidores como colchicina e monesina (Hightower and Guidon 1989). Em ambiente extracelular, a HSP60 sozinha ou combinada com alguma proteína própria ou microbiana, age como uma ligação entre as células

do sistema imune culminando na sua ativação. Essa habilidade de se comportar como uma ligação entre os componentes do sistema imune é dividida por outras chaperonas como HSP70 e HSP90 (Srivastava 2002).

Quando translocadas para a superfície celular ou liberada durante o processo de necrose, a HSP60 autóloga pode servir como antígeno de sinal de alerta que atrai o sistema imune inato ao local de estresse ou morte celular não programada, ou seja, necrose (Matzinger 1994).

A presença de HSP60 solúvel na corrente sanguínea coincide com uma série de condições inflamatórias (Henderson and Pockley; Pockley, Muthana *et al.* 2008). Foi sugerido que a HSP60 é secretada pela célula em vesículas lipídicas solúveis em detergente ou exossomos (Bausero, Gastpar *et al.* 2005; Lancaster and Febbraio 2005). A liberação de HSP60, em fragmentos ou completa, em células mortas ou danificadas, também é uma possibilidade (Basu, Binder *et al.* 2000). Embora o mecanismo exato pelo qual a HSP60 é secretada para o meio extracelular não é conhecido, está claro que esta molécula possui uma ligação entre tecidos e sistema imune.

Embora as HSPs também estejam presentes na circulação de indivíduos saudáveis (Pockley 2001; Xu 2002), seus níveis tendem a cair com o avanço da idade e aumentam em um número considerável de condições patológicas como hipertensão (Pockley, Wu *et al.* 2000), arteriosclerose e cirurgias cardíacas (Xu 2002).

A família de HSP60 de mamíferos, também chamadas de chaperoninas, consiste em HSP mitocondrial (mt-HSP60) e HSP60 citosólica (Polipetideo-1 do complexo T (Fink 1999; Hartl and Hayer-Hartl 2002). A mt-HSP60 existe em um equilíbrio dinâmico junto com monômeros, heptâmeros e tetradecâmeros

(Levy-Rimler, Bell *et al.* 2002). Se dissociam em monômeros em baixas concentrações e se associam em tetradecâmeros na presença de ATP e mt-HSP10, um co fator da mt-HSP60 (Levy-Rimler, Viitanen *et al.* 2001). A HSP60 citosólica forma estruturas em forma de anéis hetero-oligoméricos e sua função no citosol é de dobramento das proteínas do citoesqueleto como tubulina e actina (Llorca, Martin-Benito *et al.* 2000).

HSPs bacterianas, especialmente a HSP60 e HSP70, são moléculas altamente imunógenas capazes de induzir a produção de anticorpos e também ativação de células T (Zugel and Kaufmann 1999). Estas HSPs são reconhecidas por células T e anticorpos humanos, uma vez que, pode ocorrer reatividade cruzada entre as espécies (Kiessling, Gronberg *et al.* 1991). As células T e anticorpos anti HSP60 e HSP70 podem causar danos teciduais e reações inflamatórias no local. Por isso, HSP60 e 70 foram implicadas em uma gama de doenças autoimunes e condições inflamatórias como doença de Crohn (Szewczuk and Depew 1992) e artrite juvenil (Pope, Lovis *et al.* 1992).

A imunidade mediada por células é considerada um processo complexo e há vários estágios diferentes em que as proteínas de choque térmico poderiam regular a natureza qualitativa desta resposta. Primeiramente, estas proteínas podem modificar o fenótipo de células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas, em relação a expressão antigênica e secreção de citocinas, e portanto mudar também o fenótico de células T do microambiente. Em segundo lugar estas proteínas podem influenciar diretamente na funcionalidade de células T via interação direta (Pockley, Muthana *et al.* 2008).

As observações de que HSP60 e HSP70 possuem poderosos efeitos pró-inflamatórios em células da imunidade inata *in vivo* e potencial igualmente

comparável nos efeitos anti-inflamatórios é de difícil explanação. Contudo, é importante dizer que a ativação de células da imunidade inatas não leva necessariamente a um perfil pró-inflamatório uma vez que uma diversidade de famílias dos TLRs podem ser ativadas no processo. Um exemplo é a ativação do TLR9 que desencadeia um controle de doença autoimune em modelo experimental estudado por Rachmilewitz *et al.*, (2002) (Rachmilewitz, Karmeli *et al.* 2002) e Zeuner *et al.*, (2003) (Zeuner, Verthelyi *et al.* 2003) e a ativação de TLR4 em LPS bacteriano (Sai and Rivereau 1996; Tian, Zekzer *et al.* 2001). Além disso, a ativação da imunidade inata pode aumentar a expressão e liberação de HSP60 própria, o que acaba ativando células T regulatórias específicas que possuem a capacidade de controlar a inflamação local (Quintana 2005). Em estudos realizados por Cohen-Sfady *et al.*, (2005 e 2009) (Cohen-Sfady, Nussbaum *et al.* 2005; Cohen-Sfady, Pevsner-Fischer *et al.* 2009) a HSP60 se liga ao TLR4 e MyD88 ativando assim, células B que se proliferam e secretam IL-6 e IL-10, além de regular positivamente a expressão de MHCII e outras moléculas de ativação. Células B que são ativadas por HSP60 apresentam as moléculas para células T alogênicas que culmina na liberação de mais IL-10 e IFN- γ .

Não há dúvidas de que as proteínas de choque térmico podem ser fortes candidatas a moléculas imunogênicas usadas em vacinas, contudo, em condições fisiológicas, proteínas próprias ou idênticas podem ter propriedades anti inflamatórias e podem ser componentes importantes na rede complexa que envolve a regulação e/ou resolução de eventos inflamatórios (Panayi, Corrigan *et al.* 2004; van Eden, van der Zee *et al.* 2005). Esses processos são essenciais para a proteção do indivíduo contra ataques patogênicos e na

manutenção da homeostase, pois, HSP60 e HSP70 são componentes importantes neste mecanismo de homeostase. O mecanismo pelo qual estas moléculas mantêm o controle e o balanço *in vivo* ainda não é bem entendido, contudo, elas podem estar envolvidas em complexas ligações entre os membros da reposta imune, o que promove uma resposta eficaz, ao mesmo tempo destruindo patógenos e protegendo o microambiente em questão.

Baseado em trabalhos de Deepe *et al.*, (2002) (Deepe and Gibbons 2002) e Scheckelhoff *et al.*, (2005) (Scheckelhoff and Deepe 2005) a HSP60 de *H. capsulatum* foi identificada como sendo um alvo proeminente da imunidade mediada por células T e assim uma boa candidata a vacina em modelo experimental contra histoplasmose. Devido a seu alto grau de conservação evolucionária entre os genes das famílias de HSPs de *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*, foi proposto que a HSP60 proveniente de *H. capsulatum* fosse similar a HSP60 de *P. brasiliensis*.

Soares *et al.*, (2008) (de Bastos Ascenco Soares, Gomez *et al.* 2008), utilizou a HSP60 recombinante de *P. brasiliensis* em suas imunizações e obteve resultados satisfatórios. Houve um aumento das citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- γ assim como uma diminuição significativa da carga fúngica nos pulmões dos animais infectados.

Além do *H. capsulatum*, as proteínas de choque térmico de 60 kDa foram usadas com sucesso em modelos de infecção por tuberculose (Bonato *et al.* 2004)(Bonato, Goncalves *et al.* 2004), clamídia (KOL *et al.* 1998)(Kol, Sukhova *et al.* 1998) no tratamento de citomegalovírus murina (ROUVIO *et al.*, 2005)(Rouvio, Dvorkin *et al.* 2005) e em doenças auto imunes como diabetes (Quintana, Carmi *et al.* 2002) e artrite (Quintana, Carmi *et al.* 2002).

Em análises de imunoblotting, a PbHSP60 (HSP60 proveniente de *P. brasiliensis*) foi reconhecida por 72 dos 75 soros de doentes portadores de PCM. Nenhuma reatividade cruzada foi observada em soros de pacientes com aspergilose, esporotricose, criptococose e tuberculose. Reatividade a HSP60 foi observada em soro de 9,52% de indivíduos saudáveis do grupo controle e de 11,5% de pacientes com histoplasmose (Izacc, Gomez *et al.* 2001; Cunha, Zancope-Oliveira *et al.* 2002).

Ao longo dos últimos anos obtivemos resultados positivos em modelos vacinais contra a PCM utilizando o peptídeo P10, parte imunogênica da glicoproteína de 43 kDa (gp43), associado ou não com drogas clássicas antifúngicas (MUÑOZ dados não publicados); utilizando diferentes adjuvantes associados com P10 (Mayorga, Munoz *et al.* 2012); células dendríticas pulsadas com P10 (Magalhaes, Ferreira *et al.* 2012) e vacina de DNA contendo o inserto do peptídeo P10 (Rittner, Munoz *et al.* 2012). Com os recentes estudos no campo das proteínas de choque térmico, decidimos usar a versão de *P. brasiliensis* desta proteína para aumentar o amplo campo de candidatos vacinais contra a doença. Em nosso trabalho, utilizamos a HSP60 proveniente de *P. brasiliensis* (PbHSP60) e testamos em camundongos BALB/c no modelo de infecção intratraqueal para avaliar a progressão da doença e a eficácia da vacina.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A PCM é uma micose sistêmica que provoca grande debilitação do paciente, com um tratamento longo e com episódios comuns de recidiva, além de sequelas. Nosso grupo tem buscado alternativas terapêuticas, no sentido de futuramente abreviar o tratamento da doença e o custo total de internação dos pacientes, como administração de peptídeos que possibilitem uma modulação da resposta imune, controlando assim a doença, vacinas de DNA e adjuvantes. Dentre estas alternativas, as proteínas de choque térmico possuem um papel importante já demonstrado pelo nosso grupo em trabalhos passados. O estudo experimental de diferentes compostos contra a PCM faz com que nosso grupo expanda o leque de formulações vacinais para o tratamento desta micose negligenciada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar a viabilidade e a eficácia da utilização de uma vacina de DNA contendo o inserto da HSP60 de *P. brasiliensis* em conjunto ou não com plasmídeo contendo inserto de mL-12.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Avaliar o efeito da vacina DNA contendo o inserto de PbHSP60 na infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis* e analisar os efeitos da mL-12 ao longo do tratamento;

3.2.2. Avaliar níveis de citocina no macerado de pulmão dos animais submetidos ao protocolo de vacinação para determinar as possíveis populações celulares ativadas pela vacina.

3.2.3. Determinar a carga fúngica em diferentes órgãos como forma de avaliar se houve ou não uma melhora nos tecidos afetados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS.

4.1 Obtenção de RNA de *P. brasiliensis*

Células leveduriformes do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* foram cultivadas em meio líquido UBA (Apêndice A) por 5 dias, sob agitação a 150 rpm, a 37 °C. Aproximadamente 20 g de células foram maceradas em nitrogênio líquido. Após a lise das células, foram adicionados 5 ml de TRIZOL (Invitrogen, CA, USA). Seguiu-se incubação por 5 min., à temperatura ambiente e foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio. Após agitação do material, por 15 segundos, o mesmo foi incubado por 3 min., à temperatura ambiente. O macerado foi centrifugado por 15 min., a 12.000 g, a 5 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a este foi acrescentado 0,5 ml de isopropanol (Merck, Darmstadt, Germany). O material foi incubado por 10 min., à temperatura ambiente e centrifugado por 10 min., a 12.000 g, a 5 °C. O sobrenadante foi descartado e ao “pellet” acrescentou-se 1 ml de etanol (Merck) a 70%. Após agitação, o material foi centrifugado por 5 min., a 7.500 g, a 5 °C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspenso em 50 µl de água pura estéril. O produto obtido foi incubado por 10 min., a 60 °C e armazenado em freezer -70 °C.

4.2 Obtenção de cDNA por transcrição reversa

A uma alíquota de 3 µl de RNA total, foram adicionados 1 µg de “primer” oligo(dT)₁₈ (Fermentas, MD, USA) e 8,5 µl de água pura estéril. A solução foi incubada por 10 min., a 70 °C, colocada em gelo para resfriar, centrifugada por

3 segundos e novamente colocada em gelo. A reação foi concluída após a adição dos seguintes reagentes, em concentrações finais:

Tampão de reação 1X para a transcriptase reversa Revertaid M-MuLV (Fermentas), 10 mM DTT (Sigma, MO, USA), 2,5 mM dNTP Mix, 100 unidades de RNAGuard (Amersham, Uppsala, Sweden) e 1 µl de água pura estéril. O material foi incubado por 2 min., a 42°C e a ele foram adicionadas 200 unidades de Revertaid M-MuLV (Fermentas). A solução foi incubada por 2 h., a 42 °C e posteriormente, a enzima foi inativada por incubação durante 15 min., a 70 °C. Para a purificação do material, foi realizada uma precipitação onde foi adicionado, ao cDNA obtido, 2,5 µl de acetato de sódio 3M (Sigma) e 62,5 µl de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Germany). O material foi incubado por 15 min., a -80 °C, centrifugado por 10 min., a 15.000 g. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi lavado com 1 ml de etanol (Merck) a 75%, centrifugado por 10 min., a 15.000 g, secado e ressuspenso em 40 µl de água pura estéril.

Isolamento dos produtos de PCR para tratamento com enzima de restrição através de transiluminador de luz UV, as bandas específicas de DNA de HSP60 foram visualizadas e retiradas com auxílio de uma pequena espátula. Os fragmentos foram transferidos para microtubos e seguiu-se o procedimento de purificação do DNA de acordo com o kit comercial “Gel Extraction Systems” (Marligen, MD, USA). Para 400 mg de gel foram adicionados 1,2 ml de tampão de solubilização. A solução foi incubada por 15 min., a 50 °C, com agitação a cada 5 min. Após a dissolução completa do gel, incubou-se por mais 5 min., a mesma temperatura. A solução foi transferida

para um microtubo contendo fibra de retenção de ácidos nucleicos, encaixado em um tubo de descarte. O conjunto foi centrifugado por 1 min., a 12.000 g. O líquido filtrado foi descartado e, ao microtubo com fibra, foram acrescentados 700 µl do tampão de lavagem. O material foi incubado por 5 min., a temperatura ambiente e centrifugado por 1 min., a 12.000 g. O filtrado foi descartado e, ao mesmo microtubo, foram acrescentados 50 µl de tampão TE a 70 °C. O material foi incubado por 1 min., a temperatura ambiente, para eluição do DNA. Para a coleta do material, o microtubo com fibra, encaixado a um tubo coletor, foi centrifugado por 2 min., a 12.000 g.

4.3 Tratamento das amostras com enzima de restrição

Os fragmentos isolados de gel de agarose e o plasmídeo pCDNA3 (Invitrogen) foram tratados com HIND III e Eco RI da seguinte forma:

Em um microtubo, preparou-se uma solução contendo 500 ng de DNA, tampão para HIND III 1X (Fermentas) e 10 unidades de HIND III (Fermentas). A solução foi incubada por 2 h, a 37 °C e inativada por 20 min., a 65 °C. A precipitação do material foi realizada para o posterior tratamento com Eco RI. Acrescentou-se 1/10 do volume da reação acima com 3M Acetato de sódio e 2,5 vezes o volume de etanol. O material foi agitado e centrifugado por 10 min., a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado com 500 µl de etanol a 70%. O material foi centrifugado por 15 min., a 12.000 g, secado e ressuspenso em 44 µl de água pura estéril. Acrescentou-se 5 µl de tampão para Eco RI (Fermentas) e 10 unidades de Eco RI (Fermentas). A solução foi incubada por 2 h, a 37 °C e inativada por 20 min., a 65 °C.

4.4 Ligação dos fragmentos de PCR ao vetor pcDNA3

Foram utilizadas diferentes concentrações de vetor, insertos e enzima T4 DNA ligase (Fermentas). A combinação que tem se mostrado eficiente para a ligação de pCDNA3 à *PbHSP60* consiste de 300 ng do vetor incubado com 750 ng de inserto *PbHSP60*, na presença de tampão da enzima T4 DNA ligase (Fermentas) e 3 unidades da enzima T4 DNA ligase. A solução com volume total de 20 µl, foi incubada por 12 h, a 16 °C e inativada por 10 min., a 65 °C.

4.5 Preparo das amostras bacterianas eletrocompetentes

Foi realizado o esgotamento de uma amostra de *E. coli* da linhagem XL1Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacIqZM15 Tn10* (Tetr)]) (Stratagene), e uma de *E. coli* da linhagem DH5-α (F-80d*lacZ* M15 (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(*r_k⁻,m_k⁺*)*phoA**supE44 thi-1gyrA96relA1*) (Invitrogen) em placa de Petri contendo meio LB (Sigma) a 20g/L, 1,5% de ágar (BD), na presença de 20 µg/ml de tetraciclina (Sigma). Após incubação em estufa a 37 °C, um clone foi selecionado e adicionado a um tubo contendo 5 ml de meio líquido LB (BD), na presença de tetraciclina (50µg/ml) (Sigma). Após incubação O.N., a 37 °C, sob agitação a 150 rpm, frações de 1 ml foram acrescentadas a 99 ml de meio líquido novo e crescidas, sob agitação até atingirem a leitura de 0,5-0,6 para DO₆₀₀.

Alíquotas de 15 ml foram centrifugadas por 20 min., a 5.000 g, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 15 ml de água estéril e gelada. As amostras foram centrifugadas por 40 min., a 5.000 g,

a 4 °C e o sobrenadante foi novamente descartado. As células foram ressuspensas em 8 ml de água estéril e gelada, centrifugadas por 10 min., a 5.000 g e a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e às células, foi adicionado 1 ml de glicerol (Invitrogen) a 10% em água. Centrifugou-se o material por 10 min., a 5.000 g e a 4 °C, descartou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 100 µl de glicerol a 10% e congeladas, em alíquotas de 50 µl, em freezer - 70 °C.

4.6 Eletroporação

A uma cubeta de eletroporação de 2 mm (Thermo Hybaid, Middx, UK), foi adicionada uma alíquota de 50 µl de XL1Blue ou DH5-α eletrocompetentes, e 2 µl (20 ng) de pCDNA3 contendo *PbHSP60*. As amostras foram mantidas em gelo por 1 min. e a cubeta foi inserida no eletroporador (Thermo Hybaid). A eletroporação seguiu os parâmetros do equipamento determinadas para *E. coli* (2.500 V, capacitância de 25 µF e resistor de 201 R). Imediatamente, as células foram ressuspensas em 1 ml de meio SOC (Apêndice D) à temperatura ambiente e submetidas à agitação por 2 h, a 100 rpm. As células foram semeadas em placas LB/ágar contendo 50 µg/ml de ampicilina (Sigma) (para seleção de clones contendo o vetor de interesse) e crescidas O.N., em estufa a 37 °C.

4.7 Confirmação dos clones purificados por seqüenciamento

Inicialmente, foi realizada a PCR para triagem do material inserido nos vetores. Os iniciadores utilizados na construção dos produtos amplificados foram os seguintes:

Para detecção do clone de IL-12 – PCRIL12F (“forward”) – 5'-CGG GTT TGC CGC CAG AAC ACA – 3' e PCRIL12R (“reverse”) – 5'- GGC CAC CAG CAT GCC CTT GT – 3', com obtenção de um produto amplificado de 900pb.

Para detecção de HSP60 – SEQDNA3F (“forward”) – 5'- GGG CGG TAG GCG TGT ACG GTG – 3' e PCDNA3R3 (“reverse”) – 5'- GGC GTC GGA GAC TTG – 3', para um produto de 1,2 Kb; primer HSP60A – 5'- AAT AAG CTT ATG CAG CGA GCT TTT ACT - 3' e PCRDNA3R (“reverse”) – 5'- GGC ACC TTC CAG GGT CAA GG –3', sendo o produto amplificado de 2 Kb.

A amplificação do inserto para HSP60 seguiu denaturação inicial por 2 minutos, a 94 °C, 40 ciclos com denaturação por 30 segundos, a 94 °C, anelamento por 1 minuto, a 47 °C e extensão por 2 minutos., a 72 °C. A extensão final foi de 7 minutos, a 72 °C. Para IL-12, denaturação inicial por 2 minutos, a 94 °C, 30 ciclos com denaturação por 30 segundos, a 94 °C, anelamento por 1 minuto, a 45 °C e extensão por 2 minutos, a 72 °C. A extensão final foi de 7 minutos, a 72 °C.

Com o objetivo de confirmar a presença dos insertos nos plasmídios purificados, as amostras foram encaminhadas para o Centro de Estudos do Genoma Humano, no Intituto de Biociências (IB) – USP.

Para o sequenciamento, os vetores foram purificados em colunas seguindo-se o protocolo do kit comercial “Gel Extraction Systems” (Marligen, MD, USA), e foram quantificadas em gel de agarose através do padrão de quantificação “High DNA Mass Ladder” (Invitrogen, CA, USA).

Os iniciadores utilizados para o sequenciamento do inserto de HSP60 foram:

INICIADOR C (“forward”) -5'- AAT AAG CTT TGG CAA CAG TAA CGC CGT-3' e INICIADOR B (“sensu”)-5'- AAT GAA TTC CTA GAA CAT ACC CCC G-3'.

Para o sequenciamento do inserto de IL-12 foi utilizado o INICIADOR PCRIL12F e para o vetor pcDNA₃, o INICIADOR SEQDNA3F já descritos.

A reação de sequenciamento foi composta de 300 ng de DNA, 10pmol de INICIADOR, Big Dye (Applied Biosystems, CA, USA) e tampão específico. A mistura final de 10 µl foi submetida a protocolo específico para obtenção de fitas marcadas, sendo denaturação inicial por 1 minutos, a 96 °C, 25 ciclos com denaturação por 10 segundos, a 96 °C, anelamento por 10 segundos, a 50 °C e extensão por 4 minutos, a 60 °C.

O material obtido foi precipitado, através do acréscimo de 30 µl de água estéril, 60 µl de álcool isoamílico (Merck), permanecendo, por 15 min. à temperatura ambiente, centrifugado por 25 minutos, a 10.000 g. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi lavado com álcool isopropílico a 75%, centrifugado por 10 minutos, a 10.000 g. O sobrenadante foi retirado e o precipitado submetido à secagem a vácuo, por 20 minutos, a 60 °C.

Posteriormente, as amostras foram submetidas ao sequenciamento automático (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer – Applied Biosystems, CA, USA) e os resultados analisados através dos programas BioEdit e Blast (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi e www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)

4.8 Purificação de DNA plasmidial com vetor.

Um mL de cada vetor contendo os insertos de IL-12, HSP-60 e o vetor vazio pcDNA₃ foram adicionados em 100 ml de meio LB à 37° C, 'over night' (O.N), na presença de 0,005g de ampicilina. Após o crescimento, o volume foi transferido para 4,5 litros de meio LB na presença de 0,225g de ampicilina e novamente incubado, O.N., à 37° C a 7 g.

Ao fim da incubação, o volume total foi centrifugado a 6000 g por 20 minutos à 4° C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento submetido ao procedimento de extração utilizando-se kit comercial Endofree Plasmide Purification da empresa Qiagen (Valencia, CA, USA). Sucintamente, o sedimento foi ressuspensionado em 125 mL de tampão P1 (Endofree Plasmide Purification) até formar uma solução homogênea. Cento e vinte e cinco mL de um segundo tampão (P2), foi adicionado, misturando-se vigorosamente até o conteúdo tornar-se azulado e então, deixado em repouso por cinco minutos. O tampão P3 (125 mL) foi adicionado à solução e após 10 minutos, todo o volume foi filtrado seguido pela adição de 50 mL do tampão FWB2. Ao final do procedimento, 30 mL de tampão ER foi adicionado e a solução transferida para o freezer -20° C por 30 minutos.

O produto final foi submetido a uma coluna de purificação de DNA, precipitado com 70 mL de isopropanol e em seguida centrifugado por 30 min a 15.000g. O precipitado foi cuidadosamente ressuspensionado em 2 mL de etanol livre de endotoxina e novamente centrifugado à 4° C por 10 min a 15.000g. Ao sedimento seco, adicionou-se 2 mL de tampão TE e acondicionado no freezer -20° C até o momento do uso.

Os vetores pCDNA₃ e pORF-mIL-12 estão representados nas figuras 1 e 2, respectivamente. O vetor pCDNA₃ contém o posicionamento da inserção da sequência da HSP60. Como descrito anteriormente, o pORF-mIL-12 foi obtido diretamente da Invitrogen.

Figura 1: Representação do plasmídeo pcDNA₃ com inserto HSP60 (pHSP60).

Figura 2: Representação do plasmídeo pORF com inserto mIL-12 (pIL-12).

4.9 Cultivo do fungo e Preparo do Inoculo

O isolado virulento de *P.brasiliensis* Pb18, mantido em meio Sabouraud por 7 a 10 dias, foi coletado, lavado três vezes em solução salina tamponada (PBS, pH 7,2). Após as lavagens, o sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de PBS e deixou-se decantar naturalmente a fim de separar as leveduras menores e isoladas dos “grumos” que normalmente são formados durante esse procedimento. A contagem das leveduras foi realizada em Câmara de Neubauer.

4.10 Determinação da viabilidade

Para determinação da viabilidade das leveduras, utilizou-se o método de exclusão com o corante azul de Trypan. A viabilidade das leveduras em todos os experimentos foi de 95%.

4.11 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c com a média de idade entre 6 a 8 semanas. Os animais foram criados em condições de SPF (Specific Pathogen Free) no biotério de camundongos isogênicos do departamento de imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e mantidos no biotério de experimentação animal do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com animais anestesiados segundo as regulamentações nacionais e internacionais de pesquisa envolvendo animais de experimentação. Os procedimentos foram realizados no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas - USP. A eutanásia foi realizada pelo uso de câmara de CO₂, método aprovado pelos regulamentos nacional e internacional e experimentação animal. No caso do animal chegar a um estado de caquexia e perda de peso maior ou igual a 50% do peso inicial, mesmo que não seja o tempo de ensaio, o animal foi submetido à eutanásia. O protocolo de pesquisa do projeto (nº 018/10) foi aprovado pela CEUA do

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 17/03/2010.

4.12 Infecção Intratraqueal

Uma solução contendo 3×10^5 células/50µl foi utilizada para infectar os animais. Camundongos BALB/c foram anestesiados com 300 µl da associação de cloridrato de xilazina 10 mg kg^{-1} e cloridrato de ketamina 80 mg kg^{-1} , após a confirmação de que os animais não respondiam mais aos estímulos induzidos, foi feita uma pequena incisão na região da traquéia e a suspensão do fungo foi inoculada.

4.13 Esquema de Imunização

Camundongos BALB/c, machos, entre 6 e 8 semanas, foram infectados via intraqueal (i.t.) com 50 µl de suspensão fúngica contendo 3×10^5 leveduras. Após 30 dias, os animais foram imunizados, via intramuscular no quadríceps, com 50 µg do vetor contendo o inserto HSP60 de *Paracoccidioides brasiliensis*, 50 µg do vetor contendo o inserto mL-12 ou vetor vazio (pcDNA₃). Foram realizadas quatro imunizações, sendo uma por semana. Após 7 dias da última imunização, procedeu-se o sacrifício destes animais. O esquema utilizado encontra-se esquematizado a seguir:

Figura 3: Esquema de imunizações para os diferentes grupos estudados. Os animais foram infectados e após 30 dias receberam 4 doses cada grupo, sendo uma por semana. Uma semana após a última imunização, os animais foram sacrificados.

Os grupos do estudo foram os seguintes:

- Grupo Controle (animais não imunizados e não infectados);
- Grupo Infectado (animais infectados porém, não imunizados);
- Grupo pcDNA3 (animais infectados e posteriormente imunizados com o vetor vazio);
- Grupo *PbHSP60* + pcDNA₃ (animais infectados e posteriormente imunizados com o vetor contendo o inserto *PbHSP60* e pcDNA₃);
- Grupo mL-12 + pcDNA₃ (animais infectados e posteriormente imunizados com o vetor contendo o inserto mL-12 e pcDNA₃);
- Grupo *PbHSP60* + mL-12 (animais infectados animais infectados e imunizados com vetor contendo *PbHSP60* e mL-12);
- Grupo Superdosagem *PbHSP60* (animais infectados e imunizados com o dobro do vetor contendo *PbHSP60*).

4.14 Determinação da carga fúngica nos pulmões dos camundongos BALB/c

A carga fúngica foi determinada nos pulmões, fígado e baço cultivando-se os órgãos em meio Brain Heart Infusion (BHI) (BD) suplementado com 4% (vol/vol) de soro fetal bovino (Cultilab) e 5% de filtrado de cultura do isolado 192 do *P. brasiliensis*, streptomicona/penicillina 10 IU/ml (Cultilab) e cicloheximida 500mg/ml (Sigma). Após a morte dos animais em câmara de CO₂, os órgãos (pulmão, baço e fígado) foram extirpados, divididos ao meio, e pesados imediatamente. Com o auxílio de um homogeneizador manual as células foram rompidas em 1 ml de PBS, desta solução 100µL foram plaqueados e incubadas a 37°C e as colônias observadas diariamente até que nenhum aumento em UFC fosse observado e então determinado o número final de colônias.

4.15 Caracterização das citocinas: ELISA para a quantificação de IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-23 IFN-γ e TNF-α

As dosagens de citocinas foram feitas quantitativamente por ELISA de captura (BD- Pharmingen, CA, USA). Os poços foram sensibilizados com 50 µl de anticorpos monoclonais (captura) durante 12h entre 4 e 8°C. As placas foram então lavadas com PBS - Tween 20 0,05% (PBS – T) e bloqueadas com 200 µl de PBS/BSA 1% por 1h à temperatura ambiente. Após serem novamente lavadas, foram adicionados 100 µL das amostras (sobrenadante de macerado

de pulmão) e os padrões (citocinas recombinantes de camundongos – BD Pharmingen, CA, EUA) e em seguida, foram encubadas por 2h à temperatura ambiente. Após este período de incubação as placas foram novamente lavadas com PBS – Tween20 0,05% e adicionado 50µl do conjugado “Working detector (detection Ab + avidin-HRP)” em cada orifício, e incubado por 1h à temperatura ambiente. Após este período de incubação as placas foram novamente lavadas 10x com PBS Tween20 0,05%, e adicionado 50µl do substrato (TMB substrate reagent set Pharmingen) e incubadas à temperatura ambiente, no escuro por 30 minutos, sendo que a reação foi parada com 25µl de H₂SO₄ 2N, e as leituras foram feitas em comprimento de onda de 450nm (Multiskan EX, USA). Os limites de detecção das citocinas foram 7.8 pg/ml para IL-4, 31.3 pg/ml para IL-6, 15.6 pg/ml TNF-α, para IFN-γ e para IL-10 foram de 62.5 pg/ml, para IL-12 de 30pg/ml para IL-17 e IL-23 de 8pg/ml como previamente determinado pelo fabricante. As dosagens de IL-17 e IL-23 foram feitas quantitativamente por ELISA de captura (BD Bioscience, San Diego, CA), utilizando placas de 96 poços (Corning Costar 9018, NY, USA). De acordo com as instruções do fabricante. O anticorpo de detecção e a enzima Avidin-HRP foram adicionados separadamente (100 µL/poço), com tempo de incubação de 1 h tanto para o anticorpo como para a enzima. Após incubação, as placas foram lavadas e foram adicionados 100 µL/poço do substrato (TMB substrate solution), em seguida foram incubadas durante 15 minutos, e posteriormente foram adicionados 50 µL/poço da solução de parada H₂SO₄ 2 N. As leituras foram feitas em comprimento de onda de 450 nm (Multiskan EX, USA).

4.16 Histologia

Um fragmento de tecido pulmonar foi acondicionado em um tubo contendo formalina (Merck, Germany) 10% e enviada para realização da análise histológica utilizando a coloração de Grocott.

4.17 Análise estatística

A Análise estatística foi realizada utilizando software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA). Foi aplicado o teste não-paramétrico de Tukey para análise de significância e teste não paramétrico de Student com correção de Welch para comparação entre dois grupos. Valores de $P < 0.05$ indicam significância estatística.

5 RESULTADOS

5.1 Sequenciamento de amostra com inserto de HSP60, com iniciadores B e C.

Os alinhamentos abaixo, da sequência da *PbHSP60*, correspondem ao esperado, quanto à codificação para os aminoácidos presentes na proteína descrita por Izacc *et al.*, (2001) (Izacc, Gomez *et al.* 2001). A descontinuidade das regiões deve-se provavelmente aos diferentes isolados de *P. brasiliensis* utilizados para a clonagem, sendo que no trabalho original os autores utilizaram o isolado Pb01 e para a clonagem no plasmídeo pCDNA₃ foi utilizado o isolado Pb18.

INICIADOR C

```
> gb|AF059523.1| Paracoccidioides brasiliensis heat shock protein
60 (HSP60) gene,
complete cds
Length=2428
```

alignments for this subject sequence by:

Score	Percent identity	Query start
Score = 307 bits (166), Expect = 3e-83		
Identities = 208/226 (92%), Gaps = 11/226 (4%)		
Strand=Plus/Minus		
Query 135		
CCTTATGAGCAAATCTCTGCTGCTGCAGACCCACTCCAGCAGATCGGAATCGC		194
Sbjct 544		
CCTTATGAGCAAATCGCTGCTGCTGCAGACCCACTCCAGCAGATCGGAATCGC		485

```
Query 195
gagcgcgtgtggaggaagcggaggaagcggaggagaggaccaaagcccgaggaggaagTAA 254
|||||
Sbjct 484 GAGCGCGTGT-----
GGAGGAAGCGGAGGAGAGACCGAAGCCCGGAGGAAGTAA 434
```

```
Query 255
AAGCTCGCTGCATTACGAAGAAAAGATAACTTTTTTCGAGATATTACAACGCTATGAAACT 314
|||||
Sbjct 433 AAGCTCGCTGCATTACGAAGAAAAGATAACTTTTTT-
GAGATATTACAACGCTATGAAACT 375
```

```
Query 315 ATTGGAAGAT-ATAAAAAACAAGAAGAGAACAGCGCTACAATAACC 359
|||||
Sbjct 374 ATTGGTAGATTAAAAAAGGGAACAGCGCTACAATAACC 329
```

Score = 211 bits (114), Expect = 3e-54
Identities = 128/135 (94%), Gaps = 1/135 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 4 TCTTTGGGGGAGCGTAGGGGGATTC-
ATCAGGACATTTTCGTCCCTTTGGGCCGAGAGTCG 62
|||||
Sbjct 799
TCTTTGGGGAACCGTAGGGGGATTCAATCAGGACATTTTCGTCCCTTTGGGCCGAGAGTAG 740
```

```
Query 63
TGGTTACMGCCCTTTGCAAGGGTATCGATGCCCTTGAGGAGAGAAGCGCGGGCCTCTACGC 122
|||||
Sbjct 739
TGGTTACAGCCTTTGCAAGGGTATCGATACCCTTGAGGAGAGAAGCGCGGGCCTCTACGC 680
```

```
Query 123 CAAATTTGAGTTCCT 137
|||||
Sbjct 679 CGAATTTGAGTTCCT 665
```

INICIADOR B

> [gb|AF059523.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AF059523.1) Paracoccidioides brasiliensis heat shock protein 60 (HSP60) gene, complete cds
Length=2428

Score = 1618 bits (876), Expect = 0.0
Identities = 965/1008 (95%), Gaps = 15/1008 (1%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 4
ATGCCACCAACCCATGCCACCCGCACCAGACACAGCAGGCACCTTCTCCTCCGGCGCCTCA 63
```

```

|||||
|||||
Sbjct 2374
ATGCCACCACCCATGCCACCCGCACCAGACCCAGCAGGTACCTTCTCCTCCGGCGCCTCA 2315

Query 64
ACAATCGCCMCYTCCGTGGTCCCCAACAAACGACGCGACCCCGCTAGCATCTMCCAGCGCC 123
|||||
Sbjct 2314
ACAATCGCCACCTCCGTGGTCCCCAACAAACGACGCGACCCCGCTAGCATCTACCAGAGCC 2255

Query 124 GTCCTCAC-
ACCTTCAACGGATCCACAATCCCCGCCCTATCATATCCACATACTCCCCC 182
|||||
Sbjct 2254
GTCCTCACAACCTTCAACGGATCCACAATCCCCGCCCTATCATATCCACATACTCCCCC 2195

Query 183
TTCGCACTGTCTGAAGCCCCGGTTGAAATCGCTAGCGAAGTCATCCGTCAGTTTCCCAACG 242
|||||
Sbjct 2194
CTCGCACTGTCTGAAGCCCCGGTTGAAATCGCCCCGGAAGTCGTCCGTCAGTTTCCCAACG 2135

Query 243
ATAACGGAGCCCTCAAGCCCGGAGTTTTCGACGATGGTGCGCGCGGGACGCGTGATGGCG 302
|||||
Sbjct 2134
ATAACGGAGCCCTCAAGCCCGGAGTTTTCGACGATGGTGCGCGCGGGACGCGTGATGGCG 2075

Query 303
TTCTTGATGATGGAGATGCCGAGTTTCTGGTCTGAAGTTGGTCGGGTTGAGGGATGTGAGG 362
|||||
Sbjct 2074
TTCTTGATGATGGAGATTCCGAGTTTCTGGTCTGAAGTTGGTCGGGTTGAGGGATGTGAGG 2015

Query 363
CCGTTGGCAGCGGCTTTGAGGAGGGCCGTGCCACCGCCGGAAGGATGCCTTCTTCGACG 422
|||||
Sbjct 2014
CCGTTGGCAGCGGCTTTGAGGAGGGCCGTGCCACCGCCGGAAGGATGCCTTCTTCGACG 1955

Query 423
GCGGCGCGGGTGGCATTTCAGTGCGTCGACGACGCGGTCCTTCTTCTCGCCTACTTCGATC 482
|||||
Sbjct 1954
GCGGCGCGGGTGGCGTTTCAGTGCGTCGACGACGCGGTCCTTTTCTCGCCTACTTCGATC 1895

Query 483
TCGGAGGCCCCGCCCACTTTAATTACGGCGACGCCGCCGAGAGCTTGGCGAGGCGTTCT 542
|||||
Sbjct 1894
TCGGAGGCCCCGCCCACTTTAATTACGGCGACGCCGCCGAGAGCTTGGCGAGGCGTTCT 1835

```

```

Query 543
TGGAGTTTCTCCTTTTCGTAGTCGGAGGTTGCTGGATCGGAGATGACGGAACGGATCTGC 602
|||||
Sbjct 1834
TGGAGTTTCTCCTTTTCGTAGTCGGAGGTTGCTGGATCGGAGATGACGGAGCGGATCTGC 1775

Query 603
TCGCAGCGTTGTGCGATGGCGTCCTTGCTACCTTCACCGTTAAGGATGATGGTGTCTTCC 662
|||||
Sbjct 1774
TCGCAGCGTTGGGCGATGGCGTCCTTGCTACCTTCACCGTTAAGGATGATGGTGTCTTCC 1715

Query 663
TTTGTGATGGTGATGGAGCCAGTGGAGCCGAGCATGTCTGGAGTTGCTTTTTTCGAGTTTG 722
|||||
Sbjct 1714
TTTGTGATAGTGATGGAGCCAGTGGAGCCGAGCATGTCTGGAGTTGCTTTTTTCGAGTTTG 1655

Query 723
AGGTCGAGCTCGTCGGTGAAAACAGTGGCGTTGGTTAGGATGCCGATGTCGCCAAGGATG 782
|||||
Sbjct 1654
AGGTCGAGCTCGTCGGTGAAAACAGTGGCATTTGGTTAGGATGCCGATGTCGCCAAGGATG 1595

Query 783
GATTTGCGGTTGTTCGCCAAATCCTGGGGCTTTGACGGCAGCAACTTGCAAGTTGGGCTCGG 842
|||
Sbjct 1594
GATTTGCGGTTGTTCGCCAAATCCTGGGGCTTTGACGGCAGCAACTTGCAAGTTGGCCCCGG 1535

Query 843 AGCT-GT-GAGGATGCAGACGGCGAGGGCTTCMC-
TTCGATGTCTCTGCGATGATA-CG 898
||
Sbjct 1534
AGCTTGTGAGGATACAGACGGCGAGGGCTTCACCTTCGATGTCCTCTGCAATGATAACG 1475

Query 899 AGAGGGCGTCGGAGACTTGTG-AGGCTTC-AGGGCTG-A-TA-
TATCCTGGAAGTCA-A 952
|||||
Sbjct 1474 AGAGGGCGTCGGAGACTTGTGGAGGCTTCCAGGGCTGGAATAATATCTTGGA-
CTGCAGA 1416

Query 953 GAATT-CTTCTM-GAAAGCAGATTCAGGGCCTTYCTCCAATTCGACCT 998
|||
Sbjct 1415 GATTTTCTTCTCAGAAAGCAGAATCAGGGGCTT-CTCAAATTCGACCT 1369

```

5.2 Sequenciamento de amostra com inserto de mL-12, com iniciador

PCRIL12F

O alinhamento abaixo, da sequência da IL-12, foi realizado para confirmação do inserto IL-12 murina constituída pelas porções p35 e p40 presentes no plasmídeo pORF-mIL-12. O resultado obtido comprova a presença de uma das duas porções existentes no plasmídeo, a p35.

[ref|NT_039240.7|Mm3_39280_37](#) Mus musculus chromosome 3 genomic contig, strain C57BL/6J
Length=80458789

Score = 250 bits (135), Expect = 2e-63
Identities = 135/135 (100%), Gaps = 0/135 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 454
ACCTCCTCTTTTTGGCCACCCTTGCCCTCCTAAACCACCTCAGTTTGGCCAGGGTCATTC 513

|||||
Sbjct 17878298
ACCTCCTCTTTTTGGCCACCCTTGCCCTCCTAAACCACCTCAGTTTGGCCAGGGTCATTC 17878357

Query 514
CAGTCTCTGGACCTGCCAGGTGTCTTAGCCAGTCCCGAAACCTGCTGAAGACCACAGATG 573

|||||
Sbjct 17878358
CAGTCTCTGGACCTGCCAGGTGTCTTAGCCAGTCCCGAAACCTGCTGAAGACCACAGATG 17878417

Query 574 ACATGGTGAAGACGG 588
|||||
Sbjct 17878418 ACATGGTGAAGACGG 17878432

5.3 Sequenciamento do vetor pcDNA3 com iniciador SEQDNA3F

[gb|DQ886588.1|](#) Expression vector pcDNA3-hFIX, complete sequence
Length=8223

Score = 1323 bits (716), Expect = 0.0
Identities = 745/758 (98%), Gaps = 9/758 (1%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 149
CACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAATGC 208
      |||||
|||||||
Sbjct 3737 CACT-
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAATGC 3795

Query 209
TAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC 268
      |||||
|||||||
Sbjct 3796
TAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC 3855

Query 269
CTCCCCCGTGCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACCTGTCCTTTCCTAATAAAAA 328
      |||||
|||||||
Sbjct 3856
CTCCCCCGTGCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACCTGTCCTTTCCTAATAAAAA 3915

Query 329
TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTgggggggtgggggtggg 388
      |||||
|||||||
Sbjct 3916
TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGG 3975

Query 389
gCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGG 448
      |||||
|||||||
Sbjct 3976
GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGG 4035

Query 449
CTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCC 508
      |||||
|||||||
Sbjct 4036
CTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCC 4095

Query 509
CTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACT 568
      |||||
|||||||
Sbjct 4096
CTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACT 4155

Query 569
TGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCCTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGC 628
      |||||
|||||||
Sbjct 4156
TGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCCTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGC 4215

Query 629 CGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGC-
TCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTT 687

```



```

|||||
|||||
Sbjct  4216  CGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGG-
CATCCCTTTAGGGTTCGATTAGTGCTT  4274

Query  688
TACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGC  747

|||||
Sbjct  4275
TACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGC  4334

Query  748
CCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCT  807

|||||
Sbjct  4335
CCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCT  4394

Query  808  TGTTCCAA-CTGGAACA-CACTCAACC-
TATCTCGGTYTATTCTTTTGATTATAAGG-A  863

|||||
Sbjct  4395
TGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGA  4454

Query  864  TTT-GCCGATTTCGGCCTWTTGGTTAAAAA-TGAGCTG  899
|||||
Sbjct  4455  TTTTGGGGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTG  4492

```

Os resultados dos sequenciamentos variaram de 92 a 100%, confirmando assim a porcentagem aceitável da pureza dos incertos.

5.4 Ensaios de infecção com *P. brasiliensis* e posterior tratamento com vetores de interesse em camundongos BALB/c.

Para estes grupos de animais, foi realizada inicialmente infecção intratraqueal e após 30 dias de infecção, os animais foram imunizados, por via intramuscular, com os vetores contendo os insertos do pcDNA₃ apenas, *PbHSP60* e da IL-12, nas concentrações e número de doses descritas

anteriormente por quatro semanas, sendo uma dose por semana. Uma semana após a última imunização, os animais foram sacrificados.

5.5 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias a partir de macerado de pulmão, fígado e baço.

Após quatro semanas de tratamento, os camundongos foram sacrificados e a carga fúngica foi determinada nos pulmões, fígado e baço cultivando-se os órgãos em meio BHI. Foi observada significativa diminuição de UFC nos pulmões de camundongos BALB/c em dois grupos. A melhor combinação de vetores utilizada foi com os insertos da pcDNA₃ + *PbHSP60* e do *PbHSP60x2*, sendo que resultaram em uma melhora em termos de recuperação da infecção por *P. brasiliensis* e todos os tratamentos mostraram uma redução significativa das UFC no pulmão e baço mas não em fígado.

Figura 4: UFCs de pulmão de camundongos BALB/c infectados intratraquealmente com 5×10^5 leveduras de Pb18 e tratados com o vetor vazio, *PbHSP60* e da *mIL-12* (*pIL-12*). Foram utilizados, como controles animais, somente infectados e não tratados (controle - infectado) ou tratados com vetor sem inserto (*pcDNA₃*). * significância ($p < 0,05$); *** significância ($p < 0,0001$) relativa aos camundongos infectados e não tratados. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 5: UFCs de fígado de camundongos BALB/c infectados intratraquealmente com 5×10^5 leveduras de Pb18 e tratados com o vetor vazio, *PbHSP60* e da mL-12 (pIL-12). Foram utilizados, como controles animais, somente infectados e não tratados (controle - infectado) ou tratados com vetor sem inserto (pcDNA₃). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 6: UFCs de baço de camundongos BALB/c infectados intratraquealmente com 5×10^5 leveduras de Pb18 e tratados com o vetor vazio, *PbHSP60* e da mIL-12 (pIL-12). Foram utilizados, como controles animais, somente infectados e não tratados (controle - infectado) ou tratados com vetor sem inserto (pcDNA₃). ** significância ($p < 0,01$); *** significância ($p < 0,0001$) relativa aos camundongos infectados e não tratados. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

5.6 Quantificação de citocinas pelo método ELISA após o sacrifício dos camundongos BALB/c

5.6.1. Quantificação de IFN- γ e IL-12

O método de ELISA foi empregado para detecção de citocinas a partir do homogenato de pulmões de camundongos BALB/c, vacinados com os vetores contendo os insertos para pcDNA₃, mL-12 e *PbHSP60* e infectados intratraquealmente com 3×10^5 células leveduriformes de Pb18. Foram utilizados como controles de infecção, animais somente infectados e não vacinados (controle - infectado), animais vacinados com pcDNA₃ ou pORF sem inserto e animais somente manipulados, porém não infectados ou vacinados (sham).

Como mostra a figura 7 a maior produção de interferon-gama ocorreu no grupo vacinado com *PbHSP60*+IL-12 embora o grupo imunizado com *PbHSP60*x2 tenha um aumento discreto e não significativo com relação ao grupo infectado e não tratado. A produção de IL-12, na figura 8, foi relativamente constante em todos os grupos vacinados, não demonstrando relevância estatística entre os mesmos. Isso ocorre pelo fato de que o hospedeiro responde inicialmente bem a infecção do fungo e a produção desta citocina é muito importante para o resultado posterior da infecção. Apesar deste último dado não ser significativo, pode-se claramente ver uma diminuição de UFC e agrupamentos de granulomas compactos, mostrando claramente como esta citocina pró-inflamatória é importante no controle da PCM experimental.

Figura 7 - Dosagem de IFN- γ através do método de ELISA com homogenato de pulmões de camundongos BALB/c, vacinados com o vetor vazio, IL-12 (pIL-12) ou *PbHSP60* e infectados intratraquealmente com 3×10^5 células de *P. brasiliensis*. Foram utilizados como controles de infecção animais não vacinados e infectados (controle - infectado), animais vacinados com pcDNA₃ ou pORF sem inserto e animais somente manipulados, porém não infectados ou vacinados (sham). *significância ($p < 0,05$) relativa aos camundongos infectados e não tratados. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 8 - Dosagem de IL-12p40 através do método de ELISA com homogenato de pulmões de camundongos BALB/c, vacinados com o vetor vazio, IL-12 (pIL-12) ou *PbHSP60* e infectados intratraquealmente com 3×10^5 células de *P. brasilensis*. Foram utilizados como controles de infecção animais não vacinados e infectados (controle - infectado), animais vacinados com pcDNA₃ ou pORF sem inserto e animais somente manipulados, porém não infectados ou vacinados (sham). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

5.6.2. Quantificação de IL-10 e IL-4

Na figura 9 e 10 não observamos uma diferença significativa entre os grupos vacinados em relação as citocinas IL-4 e IL-10. Há uma diminuição discreta de IL-4 no grupo HSP60+IL-12 provavelmente devido a interleucina 12 que é uma citocina pró-inflamatória contrária aos efeitos da IL-4. Os níveis de IL-4 e IL-10 são equilibrados pelo fato de que a HSP60 dispara uma resposta mista no início da infecção por *P. brasiliensis* e isso faz com que a resposta seja tanto Th_1 quando Th_2 .

Figura 9 - Dosagem de IL-4 através do método de ELISA com homogenato de pulmões de camundongos BALB/c, vacinados com o vetor vazio, IL-12 (pIL-12) ou *PbHSP60* e infectados intratraquealmente com 3×10^5 células de *P. brasiliensis*. Foram utilizados como controles de infecção animais não vacinados e infectados (controle - infectado), animais vacinados com pcDNA₃ ou pORF sem inserto e animais somente manipulados, porém não infectados ou vacinados (sham). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 10 - Dosagem de IL-10 através do método de ELISA com homogenato de pulmões de camundongos BALB/c, vacinados com o vetor vazio, IL-12 (pIL-12) ou *PbHSP60* e infectados intratraquealmente com 3×10^5 células de *P. brasiliensis*. Foram utilizados como controles de infecção animais não vacinados e infectados (controle - infectado), animais vacinados com pcDNA₃ ou pORF sem inserto e animais somente manipulados, porém não infectados ou vacinados (sham).. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

5.6.3. Quantificação de TNF- α

Em comparação com o grupo controle (Infectado), TNF- α teve um aumento significativo no grupo que recebeu a dose dobrada de *PbHSP60*. Houve também um crescimento discreto, mas sem importância estatística no grupo que recebeu *PbHSP60*+pcDNA₃. Este resultado corrobora com os resultados deste grupo nas lâminas histológicas (figura 17, fotos A1 e A2), pois esta citocina em conjunto com IFN- γ faz com que haja uma diminuição significativa de granulomas e inflamação no tecido.

Figura 11 - Dosagem de TNF- α através do método de ELISA com homogenato de pulmões de camundongos BALB/c, vacinados com o vetor vazio, IL-12 (pIL-12) ou *PbHSP60* e infectados intratraquealmente com 3×10^5 células de *P. brasiliensis*. Foram utilizados como controles de infecção animais não vacinados e infectados (controle - infectado), animais vacinados com pcDNA₃ ou pORF sem inserto e animais somente manipulados, porém não infectados ou vacinados (sham). *significância ($p < 0,05$) relativa aos camundongos infectados e não tratados. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

5.6.4. Quantificação de IL-1 β

Uma outra citocina importante que atua como mediadora de inflamação é a IL-1 β . Como podemos observar na figura 12, todos os grupos que receberam *PbHSP60* conjugada ou sozinha obtiveram altas significativas nos níveis dessa citocina.

Um mecanismo natural de indução de células produtoras de IL-17 é a presença de IL-6 e IL-1 β no local da infecção. Assim, o aumento observado na secreção de IL-17 (figura 13) pode estar relacionado de forma direta ou indireta com o aumento na secreção de IL-1 β , nos animais imunizados com a *PbHSP60*, o que poderia desencadear uma via de resposta pró-inflamatória.

Figura 12 - Dosagem de IL-1 β através do método de ELISA com homogenato de pulmões de camundongos BALB/c, vacinados com o vetor vazio, IL-12 (pIL-12) ou *PbHSP60* e infectados intratraquealmente com 3×10^5 células de *P. brasiliensis*. Foram utilizados como controles de infecção animais não vacinados e infectados (controle - infectado), animais vacinados com pcDNA₃ ou pORF sem inserto e animais somente manipulados, porém não infectados ou vacinados (sham). *significância ($p < 0,05$) ; *** significância ($p < 0,0001$) relativa aos camundongos infectados e não tratados. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

5.6.5. Quantificação de IL-17 e 23

A população de células Th17 pode ser definida pela produção de citocinas como a IL-17, sendo que a IL-17A é a mais produzida seguida por IL-17F, B, D, C e E. A principal fonte de secreção desse tipo celular são as células T ativadas. Embora seja fundamental em infecções fúngicas como a PCM, o papel dessa família de citocinas ainda não é bem conhecido.

No nosso modelo experimental observamos um aumento na secreção desta citocina nos animais imunizados com *PbHSP60x2* e um discreto aumento nos outros grupos que também foram imunizados com essa molécula (Figura 13), quando comparado ao grupo controle infectado.

A interleucina 23 (IL-23) é secretada por células dendríticas e por macrófagos residentes em tecidos em resposta a sinais de stress endógenos e exógenos (Uhlig, McKenzie *et al.* 2006; Lyakh, Trinchieri *et al.* 2008). Esta interleucina é membro da família heterodimérica da IL-12. Possui uma subunidade que é estruturalmente similar à subunidade p35 da IL-12 e uma subunidade p40 com receptor α solúvel que pode se associar alternadamente a unidade p35 para gerar uma forma funcional de IL-12 (Oppmann, Lesley *et al.* 2000; Lupardus and Garcia 2008). Sendo assim, a IL-23 é importante na construção de uma resposta pro inflamatória efetiva contra infecções (Khader and Gopal 2010) e na manutenção da barreira imunológica (Marks and Craft 2009). Na figura 14 podemos observar que houve um aumento mínimo em todos os grupos que receberam HSP60, porém, sem importância estatística em relação ao controle positivo (Infectado).

Figura 13 - Dosagem de IL-17A através do método de ELISA com homogenato de pulmões de camundongos BALB/c, vacinados com vetores contendo pcDNA₃ apenas, IL-12 (pIL-12) ou PbHSP60 e infectados intratraquealmente com 3×10^5 células de *P. brasiliensis*. Foram utilizados como controles de infecção animais não vacinados e infectados (controle - infectado), animais vacinados com pcDNA₃ ou pORF sem inserto e animais somente manipulados, porém não infectados ou vacinados (sham). *significância ($p < 0,05$) ; *** significância ($p < 0,0001$) relativa aos camundongos infectados e não tratados. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 14 - Dosagem de IL-23 através do método de ELISA com homogenato de pulmões de camundongos BALB/c, vacinados com o vetor vazio, IL-12 (pIL-12) ou *PbHSP60* e infectados intratraquealmente com 3×10^5 células de *P. brasilensis*. Foram utilizados como controles de infecção animais não vacinados e infectados (controle - infectado), animais vacinados com pcDNA₃ ou pORF sem inserto e animais somente manipulados, porém não infectados ou vacinados (sham). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

5.6.6. Quantificação de IL-6

Uma das principais funções da IL-6 é contribuição para o crescimento e/ou proliferação de células B e, além disso, pode ajudar na formação de unidades formadoras de colônias de granulócitosmacrófagos (CSF-GM), o que pode reverter o estado de imunossupressão de fármacos como a dexametasona (Roilides, Blake *et al.* 1996). Na figura 15 podemos observar que não houve diferenças significativas entre os grupos além de um pequeno aumento sem importância estatística nos grupos que receberam o vetor contendo *PbHSP60*.

Figura 15 - Dosagem de IL-6 através do método de ELISA com homogenato de pulmões de camundongos BALB/c, vacinados com o vetor vazio, IL-12 (pIL-12) ou *PbHSP60* e infectados intratraquealmente com 3×10^5 células de *P. brasilensis*. Foram utilizados como controles de infecção animais não vacinados e infectados (controle - infectado), animais vacinados com pcDNA₃ ou pORF sem inserto e animais somente manipulados, porém não infectados ou vacinados (sham). Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

5.7 Histologia do pulmão de camundongos BALB/c infectados e tratados com vetores de interesse por quatro semanas e posteriormente sacrificados com 60 dias de infecção.

Em estudos realizados em nosso laboratório, dados histológicos em cortes corados com grocott (dados não mostrados), verificamos que os pulmões dos camundongos apenas infectados, apresentaram intensa infiltração de macrófagos, linfócitos e células epitelióides, parênquima pulmonar inflamado e muito comprometido e granulomas desorganizados com muitas células fúngicas em seu interior. Nos animais submetidos ao tratamento com vetores contendo pcDNA₃ e/ou *PbHSP60* e/ou IL-12, detectamos uma grande variação de resultados. As figuras 16 e 17 abaixo mostram os principais grupos estudados, onde foram obtidos os melhores resultados. Nos grupos tratados com vetor contendo *PbHSP60x2* e vetor *PbHSP60* associado ao vetor pcDNA₃ houve a formação de granulomas com melhor organização em relação ao grupo descrito acima, e com marcante redução no número de células fúngicas e inúmeras áreas preservadas.

Figura 16: Comparação histológica dos pulmões de camundongos BALB/c infectados e tratados por quatro semanas com vetores contendo inserto pcDNA₃ e/ou IL-12 e/ou PbHSP60, posteriormente sacrificados com 60 dias de infecção. (A) Animais infectados e não tratados (B) Animais infectados e tratados apenas com vetor pcDNA₃; (C) Animais infectados e tratados com vetor contendo mIL-12+pcDNA₃; (D) Animais infectados e tratados com vetor contendo PbHSP60+mIL-12. Lâminas coradas por Gomori. Aumento de 10x.

Figura 17: Comparação histológica dos pulmões de camundongos BALB/c infectados e tratados por quatro semanas com vetores contendo inserto pcDNA₃ e/ou IL-12 e/ou HSP60, posteriormente sacrificados com 60 dias de infecção. (A1, A2) Animais infectados e tratados com *PbHSP60*+pcDNA₃; (B1, B2) Animais infectados e tratados com *PbHSP60*x2. A2 e B2 correspondem a uma magnificação maior (100X) da panorâmica geral do pulmão (A1, B1; 40X). Lâminas coradas por Gomori.

6 DISCUSSÃO

A PCM é classificada como uma das principais micoses sistêmicas endêmicas e divide várias características clínicas com outras micoses como Histoplasmoze, Blastomicose Norte Americana e Coccidioidomicose. Em um ponto de vista histológico, a infecção por leveduras de *P. brasiliensis*, de um modo geral, é caracterizada por infiltrado linfocítico e mononuclear crônico, necrose tecidual e fibrose. Tais características também são observadas em outras micoses profundas e infecções causadas por patógenos intracelulares como micobactérias. Do ponto de vista clínico, a PCM pode apresentar-se como uma infecção disseminada crônica com episódios de recidiva e latência que é característico de parasitas intracelulares facultativos (LaVerda, Kalayoglu *et al.* 1999). A PCM pode afetar indivíduos imunocompetentes, mas sua forma severa, invasiva e letal só é observada em pacientes com deficiência na resposta imune celular, sugerindo assim, que a imunidade mediada por células tem um papel importante na resistência geral ao *P. brasiliensis* (Kashino, Fazioli *et al.* 2000).

Estudos experimentais (Castaneda, Brummer *et al.* 1987; Mota, Peracoli *et al.* 1988; Singer-Vermes, Caldeira *et al.* 1993) demonstraram que tanto a imunidade celular como a humoral são de extrema importância para a patogênese e evolução da PCM. As células T específicas possuem uma função importante no papel da resistência de *P. brasiliensis* ao longo do curso da infecção. Comparando-se indivíduos que possuem a doença localizada, pacientes com a forma crônica são caracterizados por possuírem sensibilidade

do tipo tardia prejudicada, alterações nas proporções celulares de CD4⁺ e CD8⁺ e um desequilíbrio nos níveis de citocinas (Mota, Peracoli *et al.* 1988; Benard, Mendes-Giannini *et al.* 1997). A indução de uma resposta celular, do tipo Th₁, é importante para o controle das infecções causadas por agentes fúngicos, onde a produção de citocinas como IL-12, IFN- γ e TNF- α é de suma importância para controlar e resolver este tipo de infecção (Cutler, Deepe *et al.* 2007).

O uso de DNA plasmidial em terapias gênicas pode ser seguro, embora a integração no genoma do hospedeiro possa produzir mutações e assim uma possível ativação de genes não expressos ou desativação de algum gene importante. Coelho *et al.*, (2006) (Coelho, Tavares *et al.* 2006) demonstraram em seu trabalho que, a vacina de DNA contendo insertos de HSP era confiável para a terapia gênica e vacinação, pois a mesma não se integrava ao genoma do camundongo imunizado.

O primeiro trabalho utilizando vacina de DNA contra a PCM foi feito por Pinto *et al.*, (2000) (Pinto, Puccia *et al.* 2000). Camundongos foram imunizados com plasmídeos contendo o gene da gp43 e, assim, houve uma resposta imune mediada por células que produziram INF- γ , IL-12 e também a secreção de anticorpos anti-gp43. Este modelo permitiu uma diminuição significativa da carga fúngica dos pulmões dos animais que foram imunizados com o vetor. Posteriormente, Rittner *et al.*, (2012) (Rittner, Munoz *et al.* 2012) demonstrou que o pcDNA₃ com inserto para o peptídeo P10 diminuiu a carga fúngica nos pulmões de camundongos infectados para as linhagens BALB/c e B10.A, principalmente no tratamento terapêutico a longo prazo. Esses resultados foram a base para nosso trabalho utilizando um vetor para expressão de

HSP60 como uma nova e alternativa estratégia vacinal, ampliando as possibilidades para um tratamento mais efetivo da PCM.

Para comprovarmos a eficácia de uma vacina, devemos analisar os níveis dos principais mediadores da resposta imune. Dentre estes mediadores, há aqueles que regulam a imunidade pró-inflamatória como o IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-12.

IFN- γ é uma citocina importante e necessária para a síntese de TNF- α pelos macrófagos, sendo assim, indispensável para estas células e sua posterior diferenciação em células epitelióides. O IFN- γ e o TNF- α são responsáveis também pela formação e manutenção do granuloma, fazendo com que a infecção não seja disseminada para outros órgãos (SOUTO *et al.*, 2000)(Souto, Figueiredo *et al.* 2000).

Nos ensaios de determinação da melhor formulação vacinal, verificamos que a imunização dobrada com o plasmídeo contendo o inserto da *PbHSP60* (HSP60x2), uma em cada coxa (50 μ g/dose) dos animais ou *PbHSP60* mais o pcDNA₃ vazio, resultaram em redução mais expressiva da carga fúngica nos órgãos analisados.

Nossos resultados mostraram que os níveis de TNF- α aumentaram significativamente no grupo de animais imunizados com a *PbHSP60x2*, o que podemos relacionar diretamente com a redução da carga fúngica nos pulmões levando em conta o efeito de sinergia entre IFN- γ e TNF- α que é de extrema importância para a atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* (Fortes, Miot *et al.* 2011). O grupo que recebeu *PbHSP60*+IL-12 teve um aumento significativo de IFN- γ enquanto os outros grupos que receberam somente a *PbHSP60* ou a mesma conjugada apresentaram um aumento discreto desta citocina. A análise

histológica feita com a coloração de Grocott-Gomori que evidência o fungo no tecido, sugere que os grupos que receberam imunizações com *PbHSP60x2* e *PbHSP60+pcDNA₃* tiveram uma redução significativa na carga fúngica do pulmão sendo que o último grupo citado obteve melhor resultado com ausência de granulomas e preservação da arquitetura do parênquima pulmonar em relação ao grupo infectado e não tratado. No grupo imunizado com *PbHSP60x2* identificamos poucos granulomas compactos e discreta inflamação entretanto, é importante ressaltar que escolhemos analisar cortes histológicos mais profundos. Não foi possível, por questões técnicas do laboratório de patologia, analisar o órgão inteiro.

Quanto à IL-12, em um experimento feito por Livonesi *et al.*, (2008) (Livonesi, Souto *et al.* 2008), camundongos knockout para porção p40 de IL-12 foram usados em um modelo de PCM. Os animais foram infectados via intravenosa com a isolado Pb 18 e 21 dias após a infecção estes animais sucumbiram à doença, pois não conseguiram controlar a proliferação fungica. A análise dos cortes histológicos desses animais indicou uma grande concentração fúngica nos pulmões com granulomas frouxos e desorganizados.

Segundo Arruda *et al.*, (2002) (Arruda, Franco *et al.* 2002), a interleucina 12 possui um papel crítico na defesa do organismo contra a PCM. Em um experimento utilizando IL-12 recombinante, em camundongos infectados com *P. brasiliensis*, pode-se observar uma redução satisfatória em relação a disseminação do fungo para órgãos como baço e fígado. Contudo, a administração desse vetor em nosso modelo pouco contribuiu para a diminuição da carga fúngica e induziu a um aumento da inflamação e de células pró-inflamatórias no foco. Talvez um dos grandes problemas com

relação a IL-12 seja a concentração. Deve-se fazer um estudo minucioso da concentração desta citocina recombinante antes da administração inicial e manutenção do protocolo devido a seu grande poder pró-inflamatório.

A interleucina 6 também apresentou um aumento não significativo entre os grupos que receberam a proteína de choque térmico de 60 kDa de *P. brasiliensis*.

Um grupo de células pró-inflamatórias que possui uma grande importância em infecções fúngicas é a família de células Th17 que produz as citocinas IL-17 (A-F), IL-22 e IL-23 que são de extrema importância, pois são críticas para a manutenção, expansão e geração da resposta Th17, que possui um papel predominante na resposta imune protetora contra doenças fúngicas, como a candidíase sistêmica (Huang, Na *et al.* 2004), através da ativação e indução de neutrófilos, proteínas antimicrobianas e quimiocinas de cunho inflamatório (Yano, Kolls *et al.* 2012). A polarização da resposta Th17 na PCM pulmonar está associada a reações inflamatórias ricas em células polimorfonucleados (PMN), as quais são eficientes no controle da carga fúngica. No entanto, estas células também podem mediar efeitos nocivos, já que podem causar dano tecidual (Loures, Pina *et al.* 2010).

Em nossos estudos, foram realizados ensaios para a quantificação das citocinas IL-17 e IL-23, com o objetivo de verificar a participação das células Th17 na resposta contra *P. brasiliensis*. No entanto, os resultados não permitiram determinar um padrão definido dos níveis destas citocinas entre os grupos de animais analisados. Desta forma, não foi possível inferir sobre a participação dos neutrófilos no controle da carga fúngica pulmonar, embora houvesse um aumento de IL-17 no grupo imunizado com HSP60x2 e um

aumento discreto, não significativo, nos outros grupos que receberam este vetor.

Em relação a IL-23, houve um aumento discreto nos níveis dessa citocina, para todos os grupos que foram imunizados com HSP60, em relação ao controle infectado e não tratado, no entanto, essas diferenças não foram significativas.

A imunidade humoral também possui grande importância na PCM (Buisa-Filho, Puccia *et al.* 2008), e em nosso protocolo, observamos elevação de níveis de IL-10, que teve aumento não significativo em todos os grupos que receberam *PbHSP60* em relação ao controle, e IL-4 nos grupos que receberam somente *PbHSP60* ou conjugada. Em um ensaio realizado com soro dos camundongos imunizados com *PbHSP60*, foi possível detectar a presença de anticorpos contra HSP60, embora em baixas quantidades (dados não mostrados). Este fato pode apresentar correlação com as afirmações em que moléculas de HSP60 podem ativar e induzir a secreção destas citocinas por células do tipo Th₂ e Treg (Cohen-Sfady, Nussbaum *et al.* 2005; Zanin-Zhorov, Cahalon *et al.* 2006).

O efeito estimulatório do vetor pcDNA₃ está associado com as sequências CpG presentes no gene de resistência a ampicilina. Um efeito imune estimulatório do CpG de um modo dependente de antígeno foi proposto por Davila *et al.*, que descreveram a expansão de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória e 'naive' induzidas por motivos de CpG (Davila, Velez *et al.* 2002).

Apesar da intensa ativação da resposta imune celular e da resposta inflamatória estimulada pelo tratamento com pcDNA₃ vazio, a terapia com *PbHSP60* (*PbHSP60x2* ou *PbHSP60+pcDNA₃*), foi capaz de restringir o

crescimento e a carga fúngica nos pulmões infectados. Os animais infectados e/ou tratados apenas com o vetor vazio e/ou IL-12, não apresentaram melhora no quadro geral e tiveram uma severa destruição do parênquima pulmonar.

Recentemente, de Amorim *et al.*, (2013) (de Amorim, Magalhaes *et al.* 2013) obtiveram resultados similares em seus experimentos, nos quais houve uma melhora significativa na arquitetura pulmonar verificada nos cortes histológicos dos animais que receberam o vetor pcDNA₃ associado com o peptídeo P10, além da redução na carga fúngica, resposta preferencialmente Th₁, indução de células de memórias e células T regulatórias.

Estudos realizados por (Long, Gomez *et al.* 2003) indicaram que a HSP60 de *H. capsulatum* é reconhecida pelo CR3 (CD11b/CD18) que estão presentes em células humanas e parece ser o ligante principal que medeia à ligação do macrófago ao fungo. Posteriormente foi demonstrado que a imunização de camundongos com HSP60 de *H. capsulatum* ou um domínio específico da proteína designado como F3, confere proteção nos animais infectados por conídios do fungo (Scheckelhoff and Deepe 2005).

Na PCM, duas HSPs (HSP60 e HSP70) foram caracterizadas e estudadas sendo que a HSP60 de *P. brasiliensis* possui grande homologia com a mesma proteína de *H. capsulatum* (Izacc, Gomez *et al.* 2001). A expressão de HSP60 em *E. coli* produz uma proteína recombinante que reage com soro de pacientes infectados com o fungo (Cunha, Zancoppe-Oliveira *et al.* 2002). A alta concentração de anticorpos levou os autores a sugerirem a utilização desse antígeno como marcador sorológico. Em um trabalho pioneiro, a HSP60 recombinante foi utilizada para testes de proteção em camundongos BALB/c, nos quais duas doses de 10 µg da proteína, associada à adjuvante, foram

administradas por via subcutânea em camundongos infectados. Os pulmões dos animais vacinados mostraram diminuição de CFU e houve aumento na liberação de IL-12 e IFN- γ . Assim, os autores concluíram que esta proteína poderia ser utilizada como vacina, apesar de relatos de efeitos inflamatórios nos animais tratados (de Bastos Ascenco Soares, Gomez *et al.* 2008).

Em 2008, Rittner *et al.*, (2008, dados não publicados) obteve resultados animadores utilizando uma associação de HSP60 e o peptídeo P10 em uma vacina de DNA. Embora os efeitos positivos da HSP60 só puderam ser observado na co-administração com outros compostos como P10 e/ou mL-12, houve um aumento nos níveis de IgG2a e IgG1 , sugerindo um equilíbrio das respostas imune celular e humoral, e uma diminuição da carga fúngica nos pulmões dos animais tratados com discreta inflamação devido a administração de mL-12. Nos resultados de Scheckelhoff e Deepe (2005) (Scheckelhoff and Deepe 2005) com HSP60, a proteção induzida por *H. capsulatum* somente foi efetiva na presença de IFN- γ , IL-12 e IL-10 endógenos.

A HSP60 é um componente chave na rede complexa em que o sistema imune se comunica com si próprio e com o corpo. Assim, podemos afirmar que esta molécula media a fisiologia do sistema imune.

Nossos resultados sugerem que a *PbHSP60* é mais um forte candidato vacinal e que, em estudos posteriores, poderia ser administrada em associação com drogas comumente utilizadas ou outros peptídeos já testados e, assim, diminuir o tempo e o custo total de tratamento.

7 CONCLUSÕES

* Os plasmídeos contendo inserto para expressão de *PbHSP60* foram eficazes na redução da carga fúngica no modelo de PCM experimental;

* O conjunto de vetores de expressão para *PbHSP60+pcDNA₃* e *PbHSP60x2* apresentaram os melhores resultados na vacinação terapêutica;

* As citocinas do macerado de pulmão mostraram uma resposta imune mista tanto para Th₁ quanto para Th₂; porém, houve uma melhora substancial nos grupos vacinados com *PbHSP60*;

* A vacinação com plasmídeo mL-12 levou a uma exacerbação da doença provavelmente devido a forte indução inflamatória.

8 ANEXO A.

Aprovação do Comitê de Ética

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **17.03.10 APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **018/10** intitulado: **“Terapia gênica na paracoccidiodomicose experimental utilizando vetor de expressão de HSP60 E mIL-12”** apresentado pelo **Departamento de Dermatologia**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Carlos Pelleschi Taborda
Pesquisador(a) Executante : Thor Andreas Silva Di Sessa

CEP-FMUSP, 17 de março de 2010.

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

9 REFERÊNCIAS

- Akira, S. (2003). "Toll-like receptor signaling." J Biol Chem **278**(40): 38105-8.
- Anderson, K. M. and P. K. Srivastava (2000). "Heat, heat shock, heat shock proteins and death: a central link in innate and adaptive immune responses." Immunol Lett **74**(1): 35-9.
- Arango, M. and L. Yarzabal (1982). "T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis." Mycopathologia **79**(2): 115-23.
- Aristizabal, B. H., K. V. Clemons, et al. (2002). "Experimental paracoccidioides brasiliensis infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses." Med Mycol **40**(2): 169-78.
- Arruda, C., M. F. Franco, et al. (2002). "Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by Paracoccidioides brasiliensis but enhances pulmonary inflammation." Clin Immunol **103**(2): 185-95.
- Asea, A., E. Kabingu, et al. (2000). "HSP70 peptidembearing and peptide-negative preparations act as chaperokines." Cell Stress Chaperones **5**(5): 425-31.
- Asea, A., M. Rehli, et al. (2002). "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." J Biol Chem **277**(17): 15028-34.
- Bagagli, E., A. Sano, et al. (1998). "Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from armadillos (Dasypus noveminctus) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis." Am J Trop Med Hyg **58**(4): 505-12.
- Basu, S., R. J. Binder, et al. (2000). "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." Int Immunol **12**(11): 1539-46.

- Bausero, M. A., R. Gastpar, et al. (2005). "Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72." J Immunol **175**(5): 2900-12.
- Benard, G., M. J. Mendes-Giannini, et al. (1997). "Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response." J Infect Dis **175**(5): 1263-7.
- Bonato, V. L., E. D. Goncalves, et al. (2004). "Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury." Immunology **113**(1): 130-8.
- Brummer, E., E. Castaneda, et al. (1993). "Paracoccidioidomycosis: an update." Clin Microbiol Rev **6**(2): 89-117.
- Buissa-Filho, R., R. Puccia, 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**(7): 3321-8.
- Bulut, Y., E. Faure, et al. (2002). "Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway." J Immunol **168**(3): 1435-40.
- Calich, V. L., T. A. da Costa, et al. (2008). "Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection." Mycopathologia **165**(4-5): 223-36.
- Calich, V. L. and S. S. Kashino (1998). "Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection." Braz J Med Biol Res **31**(5): 615-23.
- Calich, V. L., L. M. Singer-Vermes, et al. (1985). "Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*." Br J Exp Pathol **66**(5): 585-94.

- Camargo, Z. P., R. G. Baruzzi, et al. (1998). "Antigenic relationship between *Loboa loboi* and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological methods." Med Mycol **36**(6): 413-7.
- Castaneda, E., E. Brummer, et al. (1987). "Chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice: quantitation of progression and chronicity." J Med Vet Mycol **25**(6): 377-87.
- Coelho, E. A., C. A. Tavares, et al. (2006). "Mycobacterium hsp65 DNA entrapped into TDM-loaded PLGA microspheres induces protection in mice against *Leishmania* (*Leishmania*) major infection." Parasitol Res **98**(6): 568-75.
- Cohen-Sfady, M., G. Nussbaum, et al. (2005). "Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway." J Immunol **175**(6): 3594-602.
- Cohen-Sfady, M., M. Pevsner-Fischer, et al. (2009). "Heat shock protein 60, via MyD88 innate signaling, protects B cells from apoptosis, spontaneous and induced." J Immunol **183**(2): 890-6.
- Cunha, D. A., R. M. Zancoppe-Oliveira, et al. (2002). "Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*." Clin Diagn Lab Immunol **9**(2): 374-7.
- Cutler, J. E., G. S. Deepe, Jr., et al. (2007). "Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold." Nat Rev Microbiol **5**(1): 13-28.
- Davila, E., M. G. Velez, et al. (2002). "Creating space: an antigen-independent, CpG-induced peripheral expansion of naive and memory T lymphocytes in a full T-cell compartment." Blood **100**(7): 2537-45.
- De Albornoz, M. B. (1971). "Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela." Sabouraudia **9**(3): 248-53.
- de Amorim, J., A. Magalhaes, et al. (2013). "DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis induces long-term protection in presence of regulatory T cells." Microbes Infect **15**(3): 181-91.

- de Bastos Ascenco Soares, R., F. J. Gomez, et al. (2008). "Vaccination with heat shock protein 60 induces a protective immune response against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection." Infect Immun **76**(9): 4214-21.
- Deepe, G. S., Jr. and R. S. Gibbons (2002). "Cellular and molecular regulation of vaccination with heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*." Infect Immun **70**(7): 3759-67.
- Desjardins, C. A., M. D. Champion, et al. (2011). "Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis." PLoS Genet **7**(10): e1002345.
- Diniz, S. N., P. S. Cisalpino, et al. (1999). "In vitro human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens." Microbes Infect **1**(5): 353-60.
- Diniz, S. N., B. S. Reis, et al. (2004). "Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*." Vaccine **22**(3-4): 485-92.
- Donnelly, J. J., B. Wahren, et al. (2005). "DNA vaccines: progress and challenges." J Immunol **175**(2): 633-9.
- Dybdahl, B., A. Wahba, et al. (2002). "Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4." Circulation **105**(6): 685-90.
- Ferreira, M. S., L. H. Freitas, et al. (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): 253-6.
- Fink, A. L. (1999). "Chaperone-mediated protein folding." Physiol Rev **79**(2): 425-49.
- Fortes, M. R., H. A. Miot, et al. (2011). "Immunology of paracoccidioidomycosis." An Bras Dermatol **86**(3): 516-24.
- Franco, M. (1987). "Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis." J Med Vet Mycol **25**(1): 5-18.

- Franco, M., M. R. Montenegro, et al. (1987). "Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms." Rev Soc Bras Med Trop **20**(2): 129-32.
- Franco, M., A. Sano, et al. (1989). "Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **31**(3): 151-7.
- Franco, M. M., M. R. G (1982). *Anatomia patológica*, Sarvier: 97-117.
- Friedland, J. S., R. Shattock, et al. (1993). "Mycobacterial 65-kD heat shock protein induces release of proinflammatory cytokines from human monocytic cells." Clin Exp Immunol **91**(1): 58-62.
- Garmory, H. S., K. A. Brown, et al. (2003). "DNA vaccines: improving expression of antigens." Genet Vaccines Ther **1**(1): 2.
- Goes, T. S., V. S. Goes, et al. (2005). "Identification of immunogenic proteins from *Paracoccidioides brasiliensis* antigenic fractions F0, FII and FIII." Immunol Lett **101**(1): 24-31.
- 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): 124-5.
- Hanson, D. F. and P. A. Murphy (1984). "Demonstration of interleukin 1 activity in apparently homogeneous specimens of the pl 5 form of rabbit endogenous pyrogen." Infect Immun **45**(2): 483-90.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." Science **295**(5561): 1852-8.
- Henderson, B. and A. G. Pockley "Molecular chaperones and protein-folding catalysts as intercellular signaling regulators in immunity and inflammation." J Leukoc Biol **88**(3): 445-62.
- Hightower, L. E. and P. T. Guidon, Jr. (1989). "Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins." J Cell Physiol **138**(2): 257-66.

- Huang, W., L. Na, et al. (2004). "Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice." J Infect Dis **190**(3): 624-31.
- Izacc, S. M., F. J. Gomez, et al. (2001). "Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*." Med Mycol **39**(5): 445-55.
- Jiang, C., D. M. Magee, et al. (1999). "Coadministration of interleukin 12 expression vector with antigen 2 cDNA enhances induction of protective immunity against *Coccidioides immitis*." Infect Immun **67**(11): 5848-53.
- Kashino, S. S., R. A. Fazioli, et al. (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.
- Kato, K., H. Ito, et al. (1998). "Stimulation of the stress-induced expression of stress proteins by curcumin in cultured cells and in rat tissues in vivo." Cell Stress Chaperones **3**(3): 152-60.
- Kawakami, K., M. Tohyama, et al. (1996). "IL-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*." Clin Exp Immunol **104**(2): 208-14.
- Khader, S. A. and R. Gopal (2010). "IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens." Virulence **1**(5): 423-7.
- Kiessling, R., A. Gronberg, et al. (1991). "Role of hsp60 during autoimmune and bacterial inflammation." Immunol Rev **121**: 91-111.
- Kim, J., A. Nueda, et al. (1997). "Analysis of the phosphorylation of human heat shock transcription factor-1 by MAP kinase family members." J Cell Biochem **67**(1): 43-54.
- Kligman, I., J. A. Grifo, et al. (1996). "Expression of the 60 kDa heat shock protein in peritoneal fluids from women with endometriosis: implications for endometriosis-associated infertility." Hum Reprod **11**(12): 2736-8.

- Knauf, U., E. M. Newton, et al. (1996). "Repression of human heat shock factor 1 activity at control temperature by phosphorylation." Genes Dev **10**(21): 2782-93.
- Kol, A., G. K. Sukhova, et al. (1998). "Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression." Circulation **98**(4): 300-7.
- Lacaz, C. S. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis: morphology; evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. Paracoccidioidomycosis*. C. S. L. M. Franco, A. Restrepo-Moreno, and G. Del Negro. Flórida, CRC Press.
- Lancaster, G. I. and M. A. Febbraio (2005). "Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins." J Biol Chem **280**(24): 23349-55.
- LaVerda, D., M. V. Kalayoglu, et al. (1999). "Chlamydial heat shock proteins and disease pathology: new paradigms for old problems?" Infect Dis Obstet Gynecol **7**(1-2): 64-71.
- Levy-Rimler, G., R. E. Bell, et al. (2002). "Type I chaperonins: not all are created equal." FEBS Lett **529**(1): 1-5.
- Levy-Rimler, G., P. Viitanen, et al. (2001). "The effect of nucleotides and mitochondrial chaperonin 10 on the structure and chaperone activity of mitochondrial chaperonin 60." Eur J Biochem **268**(12): 3465-72.
- Lindquist, S. and E. A. Craig (1988). "The heat-shock proteins." Annu Rev Genet **22**: 631-77.
- Liu, M. A. (2003). "DNA vaccines: a review." J Intern Med **253**(4): 402-10.
- Livonesi, M. C., J. T. Souto, et al. (2008). "Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice." Med Mycol **46**(7): 637-46.
- Llorca, O., J. Martin-Benito, et al. (2000). "Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations." EMBO J **19**(22): 5971-9.

- Londero, A. T. e. R., C. D (1990). "Paracoccidioidomicose: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do estado do Rio Grande do Sul." J. Peneum **16**: 129-132.
- Long, K. H., F. J. Gomez, et al. (2003). "Identification of heat shock protein 60 as the ligand on Histoplasma capsulatum that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages." J Immunol **170**(1): 487-94.
- Loures, F. V., A. Pina, et al. (2010). "Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells." Infect Immun **78**(3): 1078-88.
- Luheshi, G. and N. Rothwell (1996). "Cytokines and fever." Int Arch Allergy Immunol **109**(4): 301-7.
- Lupardus, P. J. and K. C. Garcia (2008). "The structure of interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with interleukin-12." J Mol Biol **382**(4): 931-41.
- Lyakh, L., G. Trinchieri, et al. (2008). "Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans." Immunol Rev **226**: 112-31.
- Macchia, G., A. Massone, et al. (1993). "The Hsp60 protein of Helicobacter pylori: structure and immune response in patients with gastroduodenal diseases." Mol Microbiol **9**(3): 645-52.
- Magalhaes, A., K. S. Ferreira, et al. (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): 23-9.
- Marks, B. R. and J. Craft (2009). "Barrier immunity and IL-17." Semin Immunol **21**(3): 164-71.
- Marques, A. F., M. B. da Silva, et al. (2006). "Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of Paracoccidioides brasiliensis." Antimicrob Agents Chemother **50**(8): 2814-9.

- Masso-Welch, P. A., J. D. Black, et al. (1999). "Polarized expression of immunoglobulin, spectrin, and protein kinase C beta II occurs in B cells from normal BALB/c, autoimmune lpr, and anti-ssDNA transgenic, tolerant mice." J Leukoc Biol **66**(4): 617-24.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
- Mayorga, O., J. E. Munoz, et al. (2012). "The role of adjuvants in therapeutic protection against paracoccidioidomycosis after immunization with the P10 peptide." Front Microbiol **3**: 154.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.
- Morimoto, R. I. (1998). "Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators." Genes Dev **12**(24): 3788-96.
- Mosmann, T. R. and S. Sad (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." Immunol Today **17**(3): 138-46.
- Mota, N. G., M. T. Peracoli, et al. (1988). "Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis." J Med Vet Mycol **26**(2): 105-11.
- Muzio, M., G. Natoli, et al. (1998). "The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)." J Exp Med **187**(12): 2097-101.
- Naiff, R. D., L. C. Ferreira, et al. (1986). "[Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **28**(1): 19-27.
- Negróni, P. (1968). "[Studies on the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* in Argentina]." Torax **17**(1): 60-3.

- Ohtsuka, K., D. Kawashima, et al. (2005). "Inducers and co-inducers of molecular chaperones." Int J Hyperthermia **21**(8): 703-11.
- Old, L. J. (1985). "Tumor necrosis factor (TNF)." Science **230**(4726): 630-2.
- Oppmann, B., R. Lesley, et al. (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." Immunity **13**(5): 715-25.
- Panayi, G. S., V. M. Corrigan, et al. (2004). "Stress cytokines: pivotal proteins in immune regulatory networks; Opinion." Curr Opin Immunol **16**(4): 531-4.
- Pinto, A. R., R. Puccia, et al. (2000). "DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from paracoccidioides brasiliensis." Vaccine **18**(26): 3050-8.
- Pockley, A. G. (2001). "Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents?" Expert Rev Mol Med **3**(23): 1-21.
- Pockley, A. G., M. Muthana, et al. (2008). "The dual immunoregulatory roles of stress proteins." Trends Biochem Sci **33**(2): 71-9.
- Pockley, A. G., R. Wu, et al. (2000). "Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease." Hypertension **36**(2): 303-7.
- Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-8.
- Pope, R. M., R. M. Lovis, et al. (1992). "Activation of synovial fluid T lymphocytes by 60-kd heat-shock proteins in patients with inflammatory synovitis." Arthritis Rheum **35**(1): 43-8.
- Quijada, L., J. M. Requena, et al. (1996). "During canine viscerocutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein." Parasitology **112** (Pt 3): 277-84.
- Quintana, F. J., P. Carmi, et al. (2002). "DNA vaccination with heat shock protein 60 inhibits cyclophosphamide-accelerated diabetes." J Immunol **169**(10): 6030-5.

- Quintana, F. J., P. Carmi, et al. (2002). "Inhibition of adjuvant arthritis by a DNA vaccine encoding human heat shock protein 60." J Immunol **169**(6): 3422-8.
- Quintana, F. J. a. C., I.R. (2005). Heat shock proteins regulate inflammation by both molecular and network cross-reactivity. Molecular Chaperones and Cell Signalling A. G. P. Brian Henderson. New York, Cambridge University Press: 263–287.
- Rachmilewitz, D., F. Karmeli, et al. (2002). "Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis." Gastroenterology **122**(5): 1428-41.
- Restrepo-Moreno, A. (1994). Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidioidomycosis, Boca Raton: CRC Press: 121-130.
- Restrepo, A., C. de Bedout, et al. (1981). "Recovery of *Paracoccidioides brasiliensis* from a partially calcified lymph node lesion by microaerophilic incubation of liquid media." Sabouraudia **19**(4): 295-300.
- Ritossa, F. (1962). "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*." Experientia **18**(12): 571 – 573.
- Rittner, G. M., J. E. Munoz, et al. (2012). "Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis." PLoS Negl Trop Dis **6**(2): e1519.
- Roilides, E., C. Blake, et al. (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): 63-9.
- Romani, L. (2004). "Immunity to fungal infections." Nat Rev Immunol **4**(1): 1-23.
- Romani, L. (2008). "Cell mediated immunity to fungi: a reassessment." Med Mycol **46**(6): 515-29.
- Rouvio, O., T. Dvorkin, et al. (2005). "Self HSP60 peptide serves as an immunogenic carrier for a CTL epitope against persistence of murine cytomegalovirus in the salivary gland." Vaccine **23**(27): 3508-18.

- Sai, P. and A. S. Rivereau (1996). "Prevention of diabetes in the nonobese diabetic mouse by oral immunological treatments. Comparative efficiency of human insulin and two bacterial antigens, lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae*." Diabetes Metab **22**(5): 341-8.
- San-Blas, G. (1993). "Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*." J Med Vet Mycol **31**(2): 99-113.
- Satyal, S. H., D. Chen, et al. (1998). "Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1." Genes Dev **12**(13): 1962-74.
- Scheckelhoff, M. and G. S. Deepe, Jr. (2005). "A deficiency in gamma interferon or interleukin-10 modulates T-Cell-dependent responses to heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*." Infect Immun **73**(4): 2129-34.
- Shi, Y., D. D. Mosser, et al. (1998). "Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors." Genes Dev **12**(5): 654-66.
- Shikanai-Yasuda, M. A., Q. Telles Filho Fde, et al. (2006). "[Guidelines in paracoccidioidomycosis]." Rev Soc Bras Med Trop **39**(3): 297-310.
- Silva-Vergara, M. L., R. Martinez, et al. (1998). "Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil." Med Mycol **36**(1): 37-42.
- Singer-Vermes, L. M., C. B. Caldeira, et al. (1993). "Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses." Clin Exp Immunol **94**(1): 75-9.
- Skeen, M. J., M. A. Miller, et al. (1996). "Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vivo, restimulation in vitro, and modulation by other cytokines." J Immunol **156**(3): 1196-206.
- Soltys, B. J. and R. S. Gupta (1996). "Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells." Exp Cell Res **222**(1): 16-27.

- Soltys, B. J. and R. S. Gupta (1997). "Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells." Cell Biol Int **21**(5): 315-20.
- Somersan, S., M. Larsson, et al. (2001). "Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells." J Immunol **167**(9): 4844-52.
- Soti, C., E. Nagy, et al. (2005). "Heat shock proteins as emerging therapeutic targets." Br J Pharmacol **146**(6): 769-80.
- Souto, J. T., F. Figueiredo, et al. (2000). "Interferon-gamma and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice." Am J Pathol **156**(5): 1811-20.
- Srivastava, P. (2002). "Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **2**(3): 185-94.
- Stover, E. P., G. Schar, et al. (1986). "Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*." Infect Immun **51**(1): 199-203.
- Szewczuk, M. R. and W. T. Depew (1992). "Evidence for T lymphocyte reactivity to the 65 kilodalton heat shock protein of mycobacterium in active Crohn's disease." Clin Invest Med **15**(6): 494-505.
- Taborda, C. P., M. A. Juliano, et al. (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): 786-93.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, et al. (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." Immunity **11**(4): 443-51.
- Teixeira, M. D., R. C. Theodoro, et al. (2013). "*Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications." Med Mycol.

- Teixeira, M. M., R. C. Theodoro, et al. (2009). "Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus." Mol Phylogenet Evol **52**(2): 273-83.
- Tian, J., D. Zekzer, et al. (2001). "Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice." J Immunol **167**(2): 1081-9.
- Trinchieri, G. (1995). "Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity." Annu Rev Immunol **13**: 251-76.
- Tsan, M. F. and B. Gao (2004). "Cytokine function of heat shock proteins." Am J Physiol Cell Physiol **286**(4): C739-44.
- Uhlig, H. H., B. S. McKenzie, et al. (2006). "Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology." Immunity **25**(2): 309-18.
- Van Eden, W., R. van der Zee, et al. (2005). "Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation." Nat Rev Immunol **5**(4): 318-30.
- Voellmy, R. (1994). "Transduction of the stress signal and mechanisms of transcriptional regulation of heat shock/stress protein gene expression in higher eukaryotes." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **4**(4): 357-401.
- Wallin, R. P., A. Lundqvist, et al. (2002). "Heat-shock proteins as activators of the innate immune system." Trends Immunol **23**(3): 130-5.
- Wanke, B. and M. A. Aide (2009). "Chapter 6--paracoccidioidomycosis." J Bras Pneumol **35**(12): 1245-9.
- Welch, W. J. (1993). "How cells respond to stress." Sci Am **268**(5): 56-64.
- Westerheide, S. D., J. D. Bosman, et al. (2004). "Celastrols as inducers of the heat shock response and cytoprotection." J Biol Chem **279**(53): 56053-60.
- Whitesell, L., E. G. Mimnaugh, et al. (1994). "Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential

role for stress proteins in oncogenic transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(18): 8324-8.

Xu, Q. (2002). "Role of heat shock proteins in atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(10): 1547-59.

Yan, D., K. Saito, et al. (2004). "Paeoniflorin, a novel heat shock protein-inducing compound." Cell Stress Chaperones **9**(4): 378-89.

Yano, J., J. K. Kolls, et al. (2012). "The acute neutrophil response mediated by S100 alarmins during vaginal Candida infections is independent of the Th17-pathway." PLoS One **7**(9): e46311.

Zanin-Zhorov, A., L. Cahalon, et al. (2006). "Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling." J Clin Invest **116**(7): 2022-32.

Zeuner, R. A., D. Verthelyi, et al. (2003). "Influence of stimulatory and suppressive DNA motifs on host susceptibility to inflammatory arthritis." Arthritis Rheum **48**(6): 1701-7.

Zou, J., Y. Guo, et al. (1998). "Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1." Cell **94**(4): 471-80.

Zugel, U. and S. H. Kaufmann (1999). "Immune response against heat shock proteins in infectious diseases." Immunobiology **201**(1): 22-35.