Renata Amélia Bueno

**Produção e eficácia de anticorpos gerados
contra glicolipídios de *Paracoccidioides*
*brasiliensis***

Dissertação apresentada à 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

2012

Renata Amélia Bueno

**Produção e eficácia de anticorpos
gerados contra glicolipídios de
*Paracoccidioides brasiliensis***

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

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

SÃO PAULO

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bueno, Renata Amélia

Produção e eficácia de anticorpos gerados contra glicolipídios de *Paracoccidioides brasiliensis* / Renata Amélia Bueno. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.

Orientador: Carlos Pelleschi Taborda.

Descritores: 1.Paracoccidioides 2.Anticorpos 3.Glicolipídeos 4.Imunização passiva 5.Camundongos 6.Paracoccidioidomicose

USP/FM/DBD-263/12

*A Deus, por acreditar que nossa existência pressupõe uma outra
infinitamente superior*

À minha família, pelo exemplo, amor, incentivo e paciência

Ao Ronaldo, por acrescentar razão e força aos meus dias

Aos meus amigos, pelo apoio constante

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos Taborda por ter me recebido prontamente em seu laboratório e ter me dado a oportunidade de crescer não apenas profissionalmente, mas também como pessoa. Agradeço pela confiança, compreensão e amizade.

Ao Prof. Dr. Gil Benard e à Dra Gilda Del Negro pela atenção, apoio acadêmico e ensinamentos oferecidos.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia – ICB – USP pelos ensinamentos e dedicação a vida acadêmica.

Aos Professores Benedito Corrêa, Mário Henrique de Barros, Jorge Timenetsky e Sirlei Daffre por terem me recebido com tanta gentileza em seus laboratórios para que eu pudesse usar seus equipamentos.

Aos alunos e funcionários do LIM-53 pelo apoio e amizade.

À minha amiga, muito mais que querida, Martha Uran por ter ficado ao meu lado, me ajudando em tudo desde a confecção desta dissertação até o momento da defesa. Muito obrigada por ser tão especial!

Ao amigo e colega de laboratório Julian Esteban pela sua boa vontade para ajudar em tudo e a todos. Obrigada pela amizade e ensinamentos, sem os quais esse trabalho não teria sido concluído. Muito sucesso para você!

À querida Luciana Thomaz, uma das primeiras pessoas com quem tive contato no laboratório e quem me ensinou inúmeras coisas de extremo valor! Valeu Lú!

À Profa. Dra. Márcia Ribeiro Pinto, estimada amiga de casa e competente colega de laboratório. Obrigada por dividir comigo sua amizade valiosa e sabedoria imensurável. Sempre estará em meu coração!

Aos amigos do Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos por me receberem tão carinhosamente, mesmo eu pertencendo à Medicina, por me aguentarem todo esse tempo, mas principalmente pela amizade e convívio, além da ajuda preciosa na realização deste trabalho, Oriana, Glauce, Adriana Menezes, Fernanda, Thor, Leandro, Lucas, Diego, Felipe, Adriana Magalhães, Juliana Amorim, Paulinha e Vinícius. “Pelo amor, pela amizade e pelo *corazão*”.

À Shirlei, pela dedicação, conhecimentos, alegria e bons conselhos! Muito obrigada!

Ao técnico do biotério Carlos Augusto da Silva pela sua dedicação e boa vontade, cuidando tão zelosamente dos animais.

Às secretárias Eli Maria (Dermatologia) e Patrícia (LIM-53) pela prontidão no atendimento.

Ao funcionário do Laboratório de Histologia, Paulo, pelo extremo cuidado e gentileza.

Aos funcionários da Seção de Esterilização pela colaboração e apoio técnico.

Ao querido Danilo Ciccone, ex-aluno do Departamento de Parasitologia, por me receber cinco mil vezes em seu laboratório, por me ajudar nas dúvidas sobre glicoconjugados e me emprestar inúmeros reagentes.

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP, pelo auxílio à pesquisa, possibilitando a realização deste trabalho.

Às amigas Denise e Zuleima, por dividirem comigo não somente a casa, mas também suas vidas.

À Tatiani Donato, a melhor companhia que alguém poder ter, pela amizade sincera, alegria “insuportável” e coração de ouro!

Às amigas de Faculdade Mara, Carla, Maira e Alê, que mesmo longe estão sempre comigo!

Às minhas amigas bruxas de Bariri, por entenderem minha ausência e torcerem pelo meu sucesso!

À minha amiga e madrinha Jú, por sempre torcer e rezar por mim!

Aos meus amores maiores, pai, mãe e irmão, por sempre estarem ali “para o que der e vier” e suportarem minhas ausências por conta do trabalho. Obrigada por tudo!

Ao meu namorado Ronaldo, por fazer toda a diferença na minha vida! Amo!

A Deus, por iluminar o meu caminho, por me dar força nos momentos de desânimo e desespero e por todas as bênçãos recebidas. Obrigada Senhor.

Não importa aonde você parou...
Em que momento da vida você cansou...
O que importa é que sempre é possível e necessário "Recomeçar".
Recomeçar é dar uma chance a si mesmo...
É renovar as esperanças na vida e o mais importante...
Acreditar em você de novo.
Sofreu muito nesse período?
Foi aprendizado...
Chorou muito?
Foi limpeza da alma...
Ficou com raiva das pessoas?
Foi para perdoá-las um dia...
Sentiu-se só por diversas vezes?
É porque você fechou as portas até para os anjos...
Acreditou que tudo estava perdido?
Era o início da sua melhora...
Pois é...
Agora é hora de reiniciar...

Carlos Drummond de Andrade

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adotado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina.

Serviço de Biblioteca e Documentação. 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, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo. Serviço de Biblioteca e Documentação: 2005.

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

Sumário

1. Introdução	1
2. Objetivo Geral	19
2.1 Objetivos específicos	19
3. Materiais e métodos	21
3.1. Condições de cultivo de <i>P. brasiliensis</i>	21
3.2. Preparação das células de <i>P. brasiliensis</i> para a extração dos lipídios.....	21
3.3. Extração de lipídio bruto de <i>P. brasiliensis</i>	21
3.4. Purificação do glicolipídio ácido de <i>P. brasiliensis</i>	22
3.5. Produção de anticorpos policlonais	24
3.5.1 Animais utilizados.....	24
3.5.2 Imunização dos camundongos.....	24
3.5.2.1 SDS-PAGE	25
3.6. Análise, <i>in vivo</i> , da atividade dos anticorpos policlonais.....	26
3.6.1 Preparo do inóculo	26
3.6.2 Infecção Intratraqueal.....	26
3.6.3 Tratamento.....	27
3.6.3.1 Protocolo Profilático.....	27
3.6.3.2 Protocolo Terapêutico.....	27
3.6.4 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).....	28
3.6.5 Histopatologia	28
3.6.6 Detecção e quantificação de citocinas	29
3.7. Análise, <i>in vitro</i> , da atividade dos anticorpos policlonais	31
3.7.1 Ensaios de fagocitose	31
3.7.2 Ensaio de viabilidade celular - “Killing assay”	32
3.7.3 Dosagem de Óxido Nítrico (NO).....	33
3.8. Análise estatística.....	33
4. Resultados	34

4.1. Preparação das células de <i>P. brasiliensis</i> para a extração do lipídio bruto	34
4.2. Extração de glicolipídios acídicos de <i>P. brasiliensis</i>	34
4.3. Produção de anticorpos policlonais	36
4.3.1 Imunização dos camundongos com glicolipídios acídicos purificados	36
4.4. Análise da atividade, <i>in vivo</i> , dos anticorpos policlonais	38
4.4.1 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC)	38
4.4.1.1 Grupo Tratamento Profilático 15 dias	38
4.4.1.2 Grupo Tratamento Profilático 30 dias	40
4.4.1.3 Grupo Tratamento Terapêutico 45 dias	41
4.4.1.4 Grupo Tratamento Terapêutico 60 dias	42
4.4.2 Detecção e quantificação de citocinas	43
4.4.2.1 Grupo profilático 15 dias	43
4.4.2.2 Grupo profilático 30 dias	45
4.4.2.3 Grupo terapêutico 45 dias	46
4.4.2.4 Grupo terapêutico 60 dias	48
4.4.3 Histopatologia	50
4.4.3.1 Grupo profilático 15 dias	50
4.4.3.2 Grupo profilático 30 dias	51
4.4.3.3 Grupo terapêutico 45 dias	52
4.4.3.4 Grupo terapêutico 60 dias	53
4.5. Análise, <i>in vitro</i> , da atividade dos anticorpos policlonais	55
4.5.1 Ensaio de fagocitose	55
4.5.2 Ensaio de viabilidade celular “ <i>killing assay</i> ”	57
4.5.3 Determinação da liberação de Óxido Nítrico (NO)	58
5. Discussão	59
6. Conclusões	68
REFERÊNCIAS	69

Resumo

Bueno RA. Produção e eficácia de anticorpos gerados contra glicolipídios de *Paracoccidioides brasiliensis* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012.

A paracoccidioidomicose (PCM) é a infecção fúngica sistêmica de maior prevalência na América Latina, cujo agente etiológico, *Paracoccidioides brasiliensis*, é um fungo com estrutura de parede celular complexa constituída de proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos, lipídeos, polipeptídios e melanina que reúnem condições físico-químicas e biológicas para atuarem como antígenos.

Anticorpos direcionados contra antígenos presentes na parede de *P. brasiliensis* podem interferir no curso da doença. Os mecanismos com os quais anticorpos específicos medeiam à proteção contra fungos estão em processo de elucidação por vários grupos de pesquisadores. No entanto, estas moléculas podem ser protetoras, proporcionando o aumento da eficácia de células efetoras do hospedeiro contra o fungo e modular a produção de citocinas, entre outros processos.

O tratamento da PCM é relativamente eficiente, porém, é muito longo, por isso alguns pacientes desistem ou não seguem adequadamente o tratamento, resultando em reativação do foco infeccioso.

Nesse sentido, avaliamos o efeito da transferência passiva de anticorpos policlonais contra glicolipídios acídicos por meio de protocolos profiláticos e terapêuticos em animais infectados com *P. brasiliensis*. Nos ensaios *in vivo*, os resultados mostraram que os animais tratados apresentaram diminuição significativa da carga fúngica e de danos nos tecidos dos pulmões. A dosagem de citocinas apontou aumento de IFN- γ e IL-12, modulando a resposta imune para o padrão Th1. Ensaios *in vitro* demonstraram que o tratamento com anticorpos policlonais gerados contra os glicolipídios acídicos foram capazes de aumentar a atividade fagocítica, a produção de óxido nítrico e morte das leveduras de Pb 18, por macrófagos peritoneais J774. O tratamento com anticorpos policlonais contra antígenos de natureza glicolipídica mostrou ser importante ferramenta para a busca da cura da PCM.

Descritores: 1.Paracoccidioides 2.Anticorpos 3.Glicolipídeos 4.Imunização passiva 5.Camundongos 6.Paracoccidioidomicose

Summary

Bueno RA. Production and efficacy of antibodies generated against glycolipids of *P. brasiliensis* [dissertation]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP (Brazil); 2012.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic fungal infection most prevalent in Latin America, whose etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*, is a yeast with a complex cell wall structure consisting of proteins, glycoproteins, polysaccharides, lipids, and melanin polypeptides that gather physical, chemical and biological conditions to serve as antigens.

Antibodies against antigens present in the wall of *P. brasiliensis* can interfere with the course of the disease. The mechanisms by which antibodies mediate protection against fungi are in the process of elucidation by several research groups. However, these molecules may be protective, providing increased efficiency of effector cells of the host against the fungus and modulating the production of cytokines, among other things.

Treatment of PCM is relatively efficient, however, it takes long time and some patients drop out before it ends or do not follow the treatment properly resulting in reactivation of infectious focus.

Accordingly, we evaluated the effect of passive transfer of antibodies against acidic glycolipids by prophylactic and therapeutic protocols in animals infected with *P. brasiliensis*. The results of *in vivo* tests, showed that the treated animals had a significant reduction in fungal load and tissue damage

in the lungs. The noted increase in cytokine IFN- γ and IL-12 modulated the immune response to Th1. *In vitro* assays have shown that treatment with polyclonal antibodies generated against the acidic glycolipids were able to increase the phagocytic activity, production of nitric oxide and killing of yeast Pb 18 by peritoneal macrophages. Treatment with antibodies against glycolipids antigens proved to be an important tool to search for the cure of PCM.

Descriptors: 1. Paracoccidioides 2. Antibodies 3. Glycolipids 4. passive immunization 5. Mice 6. Paracoccidioidomycosis

1. Introdução

A paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica granulomatosa, de caráter crônico, de maior prevalência na América Latina. O agente etiológico, *Paracoccidioides brasiliensis*, é um fungo termodimórfico, apresentando-se como bolor à temperatura ambiente entre 19 - 25°C, que caracteriza a forma saprofítica ou infectante e, como levedura a 35 – 37°C, quando desenvolve sua forma patogênica. A transição de bolor para levedura é de especial interesse, uma vez que esta conversão é considerada um fator de patogenicidade dos fungos dimórficos (RESTREPO, 1985). A mudança de uma fase para outra é reversível. A forma mais característica destas células é a presença de múltiplos brotamentos ao redor de uma célula mãe, sendo esse aspecto conhecido como roda de leme, o que determina a identificação do fungo em culturas ou amostras clínicas (REIS e COLOMBO, 1999).

Foi identificado pela primeira vez por Adolfo Lutz no Brasil em 1908, em lesões bucais de pacientes que apresentaram sintomas como amolecimento dos dentes, comprometimento da mucosa oral, laringe, linfonodos, glândula salivar e da traqueia. Exames anatomopatológicos desses pacientes registraram presença de fungos esféricos, células gigantes, epitelióides e leveduras em exo-esporulação (LUTZ, 1908). Posteriormente, em 1912, Alfonso Splendore o classificou dentro do gênero *Zymonema*, propondo a denominação *Z. brasiliensis*. A classificação

definitiva, feita por Floriano Paulo de Almeida, foi criada em 1930, após verificar diferenças acentuadas nas características morfológicas e biológicas entre o granuloma causado pelo fungo *Coccidioides immitis*, dos Estados Unidos e o granuloma da PCM sul-americana. Após essa distinção, foi criado o gênero *Paracoccidioides* e validada a espécie *brasiliensis*. (SAN-BLAS, 2002).

Estudos de variabilidade genética de isolados de *P. brasiliensis* mostraram a existência de uma extensa variabilidade entre isolados. Foi indicada a existência de três espécies filogeneticamente distintas, sendo duas delas monofiléticas: PS2 - isolados do Brasil e Venezuela e PS3 - isolados da Colômbia e uma espécie parafilética (S1), formada por isolados do Brasil, Argentina, Peru, Paraguai e Venezuela (MATUTE et al., 2006).

Análises filogenéticas posteriores usando 21 isolados de *P. brasiliensis*, previamente identificados como S1 e PS3, revelaram a existência de um isolado atípico que apresenta alta variabilidade genética quando comparado com os demais. Esse isolado, identificado inicialmente como Pb01, se separa de todos os outros isolados analisados e pode representar uma nova espécie. Para essa espécie filogenética foi proposta uma nova nomenclatura: *Paracoccidioides lutzii* (TEIXEIRA et al., 2009).

Até o momento, não é possível afirmar com clareza o habitat natural de *P. brasiliensis*. Estudos referentes à ecologia do fungo sugerem que este pode ser encontrado em solo rico em matéria orgânica e em ambientes com variações mínimas de temperatura (SAN-BLAS, 2002), porém, também foi observado que o mesmo é incapaz de crescer em alguns solos contendo

altas quantidades de alumínio trocável e baixa saturação de bases (TERÇARIOLI et al., 2007).

P. brasiliensis foi isolado em solos do Estado do Ceará (FRANCO, 2000), em plantações de café no Estado de Minas Gerais. (SILVA-VERGARA, 1998), na Argentina (NEGRONI, 1966), e na Venezuela (DE ALBORNOZ, 1971).

Estudos mostram que os tatus (*Dasypus novemcinctus*) podem representar o hospedeiro silvestre de *P. brasiliensis*, pois foi observada correlação entre os índices de infecção micótica e as regiões que abrigam esses animais. Além disso, Vergara e Martinez (1998) identificaram células leveduriformes de *P. brasiliensis* no baço e pulmões desses animais, indicando que os mesmos não são apenas reservatórios, como também podem ser acometidos pela doença.

P. brasiliensis também tem sido isolado de cães domésticos (RICCI et al., 2004; FARIAS et al., 2005) e até na ração para estes animais (FERREIRA, 1990), no trato intestinal de morcegos (GROSE e TRAMSITT, 1995) e fezes de pinguim (GESUELE, 1989). O fungo também foi encontrado em espécies de animais silvestres, tais como porquinho da índia (*Cavia aperea*) e porco-espinho (*Sphiggurus spinosus*) (BAGAGLI et al., 2008). Grande número de estudos voltados à definição do nicho ecológico de *P. brasiliensis* apontam o solo como seu possível habitat natural.

Acredita-se que a infecção seja adquirida quando propágulos da fase micelial do fungo são inalados. Restrepo e colaboradores (1986) relataram que o tamanho dos conídios é favorável para a instalação do

micro-organismo nos alvéolos pulmonares. Após a penetração no hospedeiro, os conídios convertem-se para a forma de levedura devido à temperatura média de 36,5°C do hospedeiro, sendo esta transformação necessária para o estabelecimento da infecção (SAN-BLAS, 1993, ALMEIDA, 1996). A partir daí, o fungo pode se disseminar por via hematogênica e, ou, linfática para qualquer parte do organismo (FRANCO, 1986). A introdução cutânea direta do fungo, embora já documentada, é muito rara (CAMARGO, 2000). *P. brasiliensis* parece não possuir um sistema adaptativo eficiente para a sua transmissão, tendo em consideração que o hospedeiro humano, em geral, infecta-se acidentalmente e não existem evidências de transmissão do fungo entre indivíduos infectados e não infectados (BENARD, 2008).

Outra característica básica da PCM é se manter em um longo período de latência, podendo progredir para uma doença com formas clínicas variadas dependentes de alguns fatores, como diferentes níveis de virulência das cepas e das condições ambientais, ou falha no sistema imunológico, principalmente pela depressão da imunidade celular (BRUMMER, 1993; MENDES, 1994).

A paracoccidioidomicose tem sido observada em todas as faixas etárias, com predominância entre os 30 e os 50 anos de idade. Até a puberdade, a incidência da moléstia é igual para ambos os sexos; contudo na idade adulta, mais de 80% dos pacientes são do sexo masculino. A maior resistência das mulheres à infecção é dada pelos estrógenos (SAN-BLAS, 2002). Estudos realizados com o hormônio 17- β -estradiol indicaram seu

papel na inibição da conversão da forma de micélio para a forma de levedura, influenciando na patogenicidade do fungo (MUCHMORE; MCKOWN; MOHR, 1974; LOOSE et al., 1983). Outro fator, ainda relacionado à questão hormonal, que contribui para a menor incidência da PCM no sexo feminino, é a capacidade observada, através de experimentos *in vitro* realizados por Hong e Zhu (2004), do 17- β -estradiol em induzir a liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos, os quais são capazes de agir na destruição das leveduras por eles internalizadas.

Dentre as doenças fúngicas de foco pulmonar, a paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica mais prevalente, apresentando a maior taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas no Brasil, correspondente a 44% da causa de morte entre essas micoses (PRADO et al., 2009).

As manifestações clínicas da PCM se caracterizam pelo comprometimento de pulmões, pele, mucosa das vias aerodigestivas superiores, adrenais e de órgãos ricos no sistema fagocítico mononuclear, tais como fígado, baço, linfonodos e medula óssea (FRANCO, 1986).

Essa doença apresenta-se sob duas formas clínicas, sendo a crônica e a aguda ou subaguda (RESTREPO et al., 1973). Na forma crônica, a qual representa cerca de 90% dos casos, o indivíduo pode resolver a infecção sem o desenvolvimento de sintomatologia, sendo que em alguns casos poderão permanecer focos quiescentes. Tais focos poderão futuramente acarretar a reativação da doença, caracterizando-se esta pelo envolvimento oral ou do trato respiratório em pacientes imunocompetentes

(FRANCO et al., 1989; BENARD, 2008). Esta forma é de curso lento, manifestando-se principalmente no pulmão. Já a forma clínica aguda ou subaguda apresenta um curso mais rápido, cerca de semanas a meses, caracterizando-se por disseminação linfo-hematogênica, envolvendo o sistema fagocítico-mononuclear (FRANCO et al., 1989; BENARD, 2008). Esta forma apresenta-se predominantemente através de linfadenomegalia e lesões de pele (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A incidência da forma aguda/subaguda da paracoccidioidomicose parece estar relacionada com a temperatura e umidade absoluta do ar (BARROZO et al., 2009).

A PCM tem distribuição focal, confinada geograficamente na América Latina, sendo que o Brasil, a Venezuela, Colômbia, Equador e a Argentina são as áreas de maior prevalência. No Brasil, é encontrada principalmente na região central do estado de São Paulo (ALMEIDA, 1930; RESTREPO, 1985), além das regiões Sul, Centro-Oeste e outras localidades no Sudeste (WANKE et al., 1994).

A doença é observada principalmente em pacientes que tiveram contato direto e prolongado com o solo contaminado, como os trabalhadores rurais (MARQUES, 1983; FRANCO, 1986; GIRALDO, 1976 e RESTREPO, 1984). Acreditava-se que a PCM fosse restrita a esses indivíduos, entretanto, alguns pesquisadores relataram a presença da doença em trabalhadores da indústria, comércio e em crianças de áreas urbanas (GREER et al., 1977; EMANUEL et al., 1983; BITTENCOURT et al., 1986), fato que pode ser explicado pela migração de indivíduos infectados que adoecem nos grandes centros, onde são diagnosticados.

O fungo *P. brasiliensis* apresenta uma estrutura complexa de proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos, lipídeos e polipeptídios que reúnem condições físico-químicas e biológicas para atuarem como antígenos (CARBONELL et al., 1964; KANETSUNA & CARBONELL, 1966; MANOCHA et al., 1980 e YARZÁBAL et al., 1973).

Há um interesse particular na parede da célula deste fungo, pelo fato da mesma ser responsável pela manutenção, forma, estabilidade celular e pelos processos metabólicos do fungo, sendo, portanto, um alvo em potencial para ação das drogas antifúngicas.

Kanetsuna e colaboradores (1972) observaram que a parede celular de *P. brasiliensis* é constituída por polissacarídeos, particularmente α e β – 1,3-glucana. A presença de galactomana, um componente imunogênico, encontra-se em maior proporção na fase de bolor, enquanto que na fase de levedura pode-se observar glucosaminas e glicoproteínas. Segundo San-Blas e San-Blas (1977) a presença de α -1,3-glucana na parede celular está relacionada à virulência de *P. brasiliensis*, bem como de outras moléculas relacionadas à patogenicidade do fungo, como a melanina, considerada fator de virulência de *P. brasiliensis*, que devido a sua carga elétrica negativa, dificulta a internalização do fungo nas células fagocitárias (DA SILVA, 2006).

Dentre os glicoconjugados de importância para *P. brasiliensis* podemos destacar, pela sua importância imunológica, a glicoproteína de 43 kDa (gp43) (SAN-BLAS, 1989; PUCCIA, 1991). Pelo seu indiscutível papel imunogênico, é o principal antígeno utilizado para o diagnóstico da PCM e quase todos os soros de pacientes reconhecem essa molécula (TABORDA

et al., 1998). A gp43 é expressa de forma constitutiva na fase micelial e leveduriforme do fungo (GOLDANI et al., 1994), contém uma única cadeia de oligossacarídeos (Almeida et al., 1996) e foi caracterizada bioquimicamente por Puccia e colaboradores em 1986. A partir da purificação desta glicoproteína por imunoafinidade, utilizando-se primeiramente soro de coelho (PUCCIA et al., 1991) e, posteriormente, anticorpos monoclonais (mAb) (PUCCIA e TRAVASSOS, 1991), foi possível isolar a gp43 com alto grau de pureza.

Em estudos mais aprofundados da sequência da gp43, foi encontrado um epítipo de 15 aminoácidos responsável pela reatividade imunológica, denominado de peptídeo 10 (P10), o qual é reconhecido pelos linfócitos T CD4+ (TRAVASSOS et al., 1995). Taborda e colaboradores (1998) demonstraram que a imunização com gp43 e P10 leva à proteção contra *P. brasiliensis in vivo*.

Em outros estudos, autores demonstraram que a gp43 inibe a fagocitose in vitro de *P. brasiliensis*, por macrófagos peritoneais de camundongos, sugerindo que essa molécula também possa estar envolvida na inibição da ativação e na habilidade das células de eliminar o fungo. Baseado nessas observações é sugerido que a gp43 medeia um mecanismo de escape do fungo, o que facilita o estabelecimento da infecção primária em hospedeiro susceptível (ALMEIDA et al., 1998; POPI et al., 2002).

Outra glicoproteína de importância secretada por *P. brasiliensis* é a gp70, que possui alto grau de reconhecimento nos soros de pacientes com

paracoccidioidomicose (PUCCIA et al., 1986). Tanto gp43 e 70 induzem resposta de linfoproliferação (BERNARD et al., 1997).

Outras moléculas, presente nos fungos, e que nos últimos anos tem despertado o interesse de alguns grupos de pesquisadores, são os glicolipídios, os quais estão envolvidos em várias funções como crescimento, adesão, mediadores de reconhecimento, diferenciação celular, modulador na transdução de sinais, regulador da proliferação celular e têm sido muito estudados em mamíferos, ao contrário dos fungos, onde pouco se sabe sobre suas funções, bem como suas localizações intracelulares (BARRETO-BERGTER et al., 2004 e 2006). Esses componentes apresentam fortes reações sorológicas em humanos (NIMRICHTER et al., 2005; BERTINI et al., 2007) ou ainda são capazes de causar efeitos imunossupressores. É de grande interesse o papel desses glicolipídios para auxiliar no esclarecimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o fungo, patogenia, virulência e resposta imune, visando o estabelecimento de novos alvos para a terapia e o diagnóstico da PCM.

Os glicolipídios são encontrados em todas as células eucarióticas e variam na sua estrutura. Toledo et al. (1995) identificaram monohexosilceramida (CMH) e glicosfingolipídicos acídicos nas formas de levedura e micélio de *P. brasiliensis*. Ambas as formas do fungo contém um glicolipídio neutro (CMH) e dois glicolipídicos acídicos pertencentes à classe dos glicosilinositol fosforilceramida - GIPCs. A fração de glicolipídios acídicos de *P. brasiliensis* é objeto de estudo do presente trabalho.

Levery e colaboradores (1998) caracterizaram as estruturas dos dois glicolipídios ácidos e os denominaram como Pb-1 e Pb-2, como demonstrado abaixo:

Pb-1(Pb-3): $\text{Gal}f\ 1\beta\text{-}6(\text{Man}\alpha\text{1-}3)\text{Man}\alpha\text{1-}2\text{Ins-P-Cer}$

Pb-2: $\text{Man}\alpha\text{1-}3\text{Man}\alpha\text{1-}2\text{Ins-P-Cer}$

Gal f: Galactofuranose; *Ins*: Inositol; *Cer*: Ceramida R = Cer-P-

A nomenclatura da fração ácida Pb-1 foi alterada para Pb-3, usada atualmente (TOLEDO et al., 2007).

Toledo e colaboradores (1995) estudaram as frações de glicolipídios ácidos, nas fases de levedura e micélio de *P. brasiliensis* (18 e 339), concluindo que o percentual de glicolipídios ácidos foi maior no micélio do que na forma de levedura em ambas as cepas. O Pb-3 está presente em

levedura e micélio de ambas as cepas em uma concentração similar. Entretanto, o Pb-2 está 6,8 vezes mais em micélio do que levedura da cepa 339, enquanto que na cepa 18 o Pb-2 é encontrado em uma quantidade maior em micélio do que levedura. O Pb-2 representa aproximadamente 40% dos glicolipídios ácidos em micélio, e menos de 10% em levedura, sugerindo que esta molécula pode estar relacionada com a diferenciação morfogênica do fungo.

A porção lipídica dos antígenos Pb-3 e Pb-2 é constituída por uma ceramida composta por um ácido graxo (h24:0) e uma fitoesfingosina (t18:0) (TOLEDO et al. 1995). Comparando as estruturas do Pb-3 com o Pb-2, pode-se sugerir que o Pb-2 seja provavelmente o precursor do glicolipídio Pb-3.

Bertini e colaboradores (2007) demonstraram que soros de pacientes com PCM reconhecem unidades de galactofuranose (Gal β) dos glicoensfingolipídios ácidos. Esses soros apresentam altos títulos contra estes açúcares, antes da terapia, decaindo após cinco meses de tratamento, indicando uma potencial aplicação deste antígeno no estudo da resposta imune de pacientes acometidos por paracoccidiodomicose.

Toledo et al. (1995) e Bertini (2007) demonstraram que o glicolipídio ácido Pb-3 é reconhecido por 100% dos soros de pacientes com PCM e não por soros de pacientes com Histoplasmose e doença de Jorge Lobo, sendo as unidades Gal β presentes nessa estrutura responsáveis por conferir atividade antigênica a essa fração.

Bertini et al. (2007) verificaram que soros de pacientes com PCM foram altamente reativos com o glicolípido Pb-3 e não reconheceram o glicolípido Pb-2, confirmando a unidade de galactofuranose como extremamente importante para o reconhecimento de anticorpos.

Silva (2007) produziu, em nosso laboratório, extrato lipídico bruto a partir de *P. brasiliensis* e detectou, *in vivo*, a produção de anticorpos, e estes reconheceram, através de ELISA e HPTLC-immunostaining, lipídios bioativos, como CMH e glicosfingolípídios ácidos. Ainda neste trabalho, leveduras opsonizadas com soro inativado de camundongos imunizados com extrato lipídico bruto foram internalizadas com mais eficiência pelos macrófagos.

Em outros modelos infecciosos, estudos realizados com glicolípídios de *L. mexicana* demonstraram a capacidade desses compostos em modular a resposta imune, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos estimulados por glicolípídios (CARRADA et al., 2007). Os glicolípídios também estão envolvidos no mecanismo de escape da Leishmania, bloqueando a formação de fagolisossomos em macrófagos (LODGE e DESCOTEAUX, 2004).

Frações antigênicas das duas fases de *P. brasiliensis* têm sido analisadas desde o início dos anos 70 através de diferentes imunoensaios. A preparação de antígenos altamente específicos de *P. brasiliensis* tornou-se, portanto, uma tarefa importante para investigadores interessados nos aspectos clínicos e epidemiológicos da PCM (SAN-BLAS, 1993).

As diferentes manifestações clínicas da PCM correlacionam-se com fatores diversos, tais como virulência e patogenicidade do isolado e susceptibilidade do sistema imunológico do hospedeiro (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A resposta imune celular mediada, em detrimento da resposta humoral, é a principal forma de defesa do organismo contra a PCM (BORGES-WALMSLEY et al., 2002). Indivíduos assintomáticos, considerados resistentes à doença, ou com formas menos severas de PCM, em geral, apresentam resposta positiva em testes de hipersensibilidade tardia (HTT) para antígenos específicos de *P. brasiliensis* (MOTA et al., 1985). Esse padrão de resposta é esperado, uma vez que as reações de HTT são mediadas por células T CD4+ do tipo Th1, responsáveis pela produção de interferon gama (IFN- γ) e de interleucina 2 (IL-2) e diversos autores têm demonstrado que respostas do tipo celular predominam na resistência à PCM severa (BENARD et al., 1996; KASHINO et al., 2000; SOUTO et al., 2000; DE OLIVEIRA et al., 2008). Por outro lado, indivíduos com PCM disseminada apresentam predomínio de resposta do tipo Th2, com aumento da expressão de IL-4, IL-5 e IL-10, diminuição dos níveis de IFN- γ (PERAÇOLI et al., 2003; PINA et al., 2006; CHIARELLA et al., 2007) e presença de elevados títulos de anticorpos específicos (BENARD et al., 1997; MAMONI et al., 2002; CHIARELLA et al., 2007). Assim, o controle da infecção depende do tipo de resposta imune desenvolvida pelo paciente e a resposta celular, Th1, está relacionada a uma resposta efetiva e protetora, ao contrário da resposta humoral, Th2, a qual pode conduzir a uma maior gravidade da doença.

A resposta imune humoral não tem papel de defesa frente à PCM aguda, produzindo grande quantidade de anticorpos persistentes durante a progressão da doença, o que sugere um papel não protetor (BENARD, 1997, CALICH, 1998).

A exacerbação da resposta humoral na PCM tem sido associada a um prognóstico ruim, já que os pacientes com forma aguda e subaguda da doença mostram os títulos de anticorpos elevados (revisado por TABORDA e TRAVASSOS, 2012).

Há muitas controvérsias sobre o papel dos anticorpos nas infecções fúngicas, inúmeros estudos suportam e denegam seu papel protetor. No entanto, faz-se necessário melhor entendimento sobre suas funções biológicas, para que se possam identificar os anticorpos protetores, definindo assim seus antígenos, para sua utilização terapêutica (CASADEVALL, 1995). Estas moléculas podem mediar a proteção pelo aumento da eficácia de células efectoras do hospedeiro contra o fungo. Anticorpos específicos podem melhorar a resposta inflamatória por promover a fagocitose e, conseqüentemente, aumentar a apresentação de antígenos e a expressão de moléculas co-estimulatórias (MONARI et al., 1999; VECCHIARELLI e CASADEVALL, 1998), ou através de modulação da produção de citocinas.

Vários cientistas demonstraram que anticorpos monoclonais podem ser protetores e não-protetores para *C. albicans* (HAN e CUTLER, 1995; MATTHEWS et al., 1995) e *C. neoformans* (DROMER et al., 1987; SANFORD et al., 1990; MUKHERJEE et al., 1992).

Uma evidência do papel protetor de anticorpos contra *C. neoformans* foi observado através de experimentos de transferência passiva de anticorpos monoclonais específicos, em vários modelos de infecção murina, os quais prolongaram a sobrevivência ou reduziram o número de células fúngicas nos órgãos dos animais infectados (DROMER et al., 1987; MUKHERJEE et al., 1992).

Na PCM, Hanna e colaboradores (2000) verificaram que na presença de anticorpos contra gp43, a aderência de *P. brasiliensis* às células epiteliais do hospedeiro é substancialmente reduzida.

Mattos-Grosso et al. (2003) utilizaram um anticorpo monoclonal contra a gp70 na investigação da patogênese de *P. brasiliensis*. Foi observado inibição da fagocitose de partículas de zimosan. Esta inibição pode ser explicada pela composição da gp70 por polissacarídeos, cujos componentes ligam-se aos receptores de manose expressos nos macrófagos.

Xander e colaboradores (2007) demonstraram que um anticorpo monoclonal contra a superfície da proteína 75 kDa foi capaz de inibir o crescimento dos fungos.

O efeito protetor de anticorpos monoclonais anti-gp43 injetados via intraperitoneal foi analisado em camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*, porém, foi verificada a existência de anticorpos não protetores. Constatou-se ainda que os anticorpos monoclonais envolvidos na redução de células fúngicas estavam relacionados ao aumento dos níveis de IFN- γ e IL-12 e os não protetores à elevada produção de IL-10, sugerindo assim a

desmistificação de trabalhos que relatam terem os anticorpos apenas ação deletéria na PCM. O grupo hipotetizou que a proteção mediada pelos anticorpos monoclonais contra a gp43 deve-se à similaridade molecular entre a gp43 e β -glucanase presente na parede do fungo, favorecendo a opsonização deste anticorpo na superfície da levedura e aumentando a fagocitose e morte intracelular do fungo (BUISSA-FILHO et al., 2008). O mesmo grupo testou o anticorpo monoclonal 3E associado à pré-imunização com P10 como agente protetor. A associação foi administrada 24 horas antes da infecção intratraqueal com isolado virulento de *P. brasiliensis* e leveduras de *P. lutzii*, obtendo ótimos resultados em comparação com um anticorpo monoclonal não-protetor (dados não publicados).

Em 2010, Toledo verificou que anticorpos contra glicosfingolípídios interferem no crescimento e diferenciação de *P. brasiliensis in vitro*.

Suzuki e colaboradores (1997) produziram um anticorpo monoclonal (mAb) denominado MEST-1 (IgG3). Esse anticorpo reconhece o glicolípídio ácido Pb-1 (atual Pb-3), e também apresenta reatividade com glicoinositol fosfolípídios (GIPL) de *Leishmania (L.) major* e glicolípídios de *T. cruzi*.

A presença de anticorpos específicos em preparações de soros policlonais corresponde a uma pequena porção do total de imunoglobulinas, e diferenças na quantidade de anticorpos, na especificidade e no isotipo podem explicar porque essas preparações nem sempre conferem proteção (CASADEVALL, 1995). Entretanto, existem evidências que a administração de anticorpos protetores podem tanto modificar o curso da infecção contra

alguns fungos patogênicos como prevenir a doença, beneficiando o hospedeiro (DROMER, 1987; MUKHERJEE, 1992).

Desde sua descoberta, a paracoccidioidomicose é alvo de intensas pesquisas, porém, devido a vários fatores como o período de latência bastante extenso, a não ocorrência de epidemias e poucos dados referentes aos casos ocorridos, uma vez que não representa uma doença de notificação compulsória, tornam o estudo desta micose bastante difícil (SHIKANAI-YASUDA, 2006; BAGAGLI, 2008).

A inserção da doença como um grave problema de saúde pública reside no fato de acometer principalmente homens na fase mais produtiva da vida (NEGRONI, 1993; WANKE e LONDERO, 1994) e que resulta em sequelas secundárias à infecção, podendo incapacitar o indivíduo para o trabalho (MOTA, 1985; BARBOSA, 1991; BRUMMER et al., 1993).

Atualmente, têm sido propostas diversos tipos de terapias utilizando moléculas bioativas, já que a cura espontânea não ocorre na paracoccidioidomicose e, o uso de antifúngicos por longos períodos torna-se tóxico aos pacientes, pois o tratamento exige longo tempo de medicação para se alcançar um resultado satisfatório, podendo durar de 2 a 6 meses e em alguns casos, perdurar por 2 ou mais anos, sendo comum observar interrupção do tratamento pelos pacientes após melhora clínica (IWAI et al., 2003; MARQUES et al., 2008). Além disso, casos de resistência aos derivados azólicos e a sulfametaxol/trimetopim têm sido registrados (HAHN et al., 2003).

Quimioterapia antifúngica é necessária para o tratamento paracoccidioidomicose, embora não haja nenhuma garantia de completa destruição do fungo, mesmo após o tratamento (TRAVASSOS e TABORDA, 2012)

De acordo com as diretrizes brasileiras, itraconazol oral é a droga de escolha, tanto para formas leves quanto para as formas moderadas da doença (revisado por TRAVASSOS E TABORDA, 2011). Contudo, nem sempre esse medicamento está disponível na rede pública de saúde, e nesses casos tem sido utilizada a combinação sulfametoxazol, trimetoprim (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Pacientes com a forma severa da doença devem ser tratados com anfotericina B ou sulfonamidas por via endovenosa e quando há é melhoria clínica podem ser substituídos por sulfonamidas orais ou azóis (revisado por TRAVASSOS e TABORDA, 2012).

Com o intuito de buscar maiores esclarecimentos sobre a patogenia da paracoccidioidomicose, bem como melhoramento das terapias propostas até o momento, o presente trabalho baseou-se na produção de anticorpos policlonais monoespecíficos contra glicolipídios extraídos da parede celular de *P. brasiliensis* como novo alvo terapêutico para essa doença.

2. Objetivo Geral

Levando em consideração a importância da produção de anticorpos direcionados a antígenos de parede celular e a busca por novas alternativas terapêuticas na PCM, este estudo buscou investigar a resposta de anticorpos, frente aos glicolipídios acídicos.

2.1 Objetivos específicos

- Produzir anticorpos policlonais direcionados contra antígeno fúngico de natureza glicolipídica (glicolipídio ácido).
- Avaliar a atividade desses anticorpos *in vitro*, durante a fagocitose mediada por macrófagos peritoneais, assim como a realização de ensaios de viabilidade celular ("*killing assay*") e dosagem de óxido nítrico na destruição do fungo.
- Investigar a associação dos anticorpos policlonais contra glicolipídio ácido, na proteção ou na exacerbação da PCM através da imunização passiva de camundongos infectados, analisando, *in vivo*, a capacidade desses anticorpos em reduzir ou aumentar a carga fúngica em camundongos infectados por via intratraqueal.
- Correlacionar os anticorpos com a resposta imune celular, através da análise do recrutamento de células ao foco infeccioso, na presença e na

ausência de anticorpos, assim como na ativação das mesmas (produção de citocinas e quimiocinas).

- Analisar a influência dos anticorpos na formação de granulomas no pulmão de camundongos infectados.

3. Materiais e métodos

3.1. Condições de cultivo de *P. brasiliensis*

P. brasiliensis, isolado Pb18, foi mantido no Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos do ICB-II, a 37°C em ágar Sabouraud dextrose.

3.2. Preparação das células de *P. brasiliensis* para a extração dos lipídios

Leveduras de *P. brasiliensis* foram transferidas para o caldo Sabouraud enriquecido com 0,5% de extrato de levedura e mantidas em agitação por 7 dias, a 37°C. Decorrido este período, as células foram mortas com timerosal (0,2 g/l) por 24 horas, coletadas após centrifugação, pesadas e congeladas a -20° C.

3.3. Extração de lipídio bruto de *P. brasiliensis*

Foram realizados três protocolos para padronização da extração. Protocolo 1: as células de *P. brasiliensis* foram delipidadas com CHCl₃:MeOH (clorofórmio/metanol), na proporção 2:1 (v/v). A delipidação foi mantida por 12 horas, sob agitação constante, a temperatura ambiente. O

extrato foi separado com o uso de filtro sinterizado e, a massa celular foi delipidada mais uma vez com $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (clorofórmio/metanol), na proporção 1:2 (v/v), e o sobrenadante das duas extrações foram combinados, concentrados em evaporador rotatório à vácuo e liofilizados, obtendo assim o lipídio bruto.

Protocolo 2: A massa celular, obtida conforme descrito anteriormente, foi delipidada 1 vez com isopropanol:hexano:água, na proporção 55:20:25, (v/v/v). A delipidação foi mantida em Erlenmeyer com capacidade para 3 litros, por 18 horas, sob agitação constante, a temperatura ambiente. O extrato obtido foi separado com o uso de filtro sinterizado e a massa celular delipidada duas vezes com $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (clorofórmio/metanol), na proporção 2:1 (v/v). O sobrenadante das extrações foram concentrados em evaporador rotatório, à vácuo.

Protocolo 3: A massa celular, obtida conforme descrito anteriormente, foi delipidada 4 vezes com isopropanol:hexano:água, na proporção 55:20:25, (v/v/v) e 1 vez com $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (clorofórmio/metanol), na proporção 2:1 (v/v) e homogeneizado em Omni-mixer. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório, à vácuo.

3.4. Purificação do glicolipídio ácido de *P. brasiliensis*

Amostras extraídas, dos diferentes protocolos, foram submetidas à cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-25, equilibrada com o solvente $\text{CHCl}_3\text{:MeOH:H}_2\text{O}$ (clorofórmio/metanol/água), nas proporções

30:60:8 (v/v/v). A eluição das amostras também foi realizada por diferentes protocolos, a fim de encontrar melhores resultados de purificação.

Protocolo 1: Glicolipídios totais foram eluídos em DEAE-Sephadex A-25, sendo que glicosfingolipídios acídicos foram eluídos em 0,2M de acetato de sódio em metanol, de acordo com Bertini et al. (2007). Essa fração foi analisada quanto ao seu perfil, por cromatografia em camada fina, utilizando como solvente de corrida CHCl_3 :MeOH:CaCl₂ (clorofórmio/metanol/cloreto de cálcio 0,02%), nas proporções 60:40:9 (v/v/v) e, revelada com 0,5% de orcinol em 3M de ácido sulfúrico (H_2SO_4).

Protocolo 2: Glicolipídios totais foram eluídos em DEAE-Sephadex A-25 com 5 volumes dos seguintes solventes: a) CHCl_3 :MeOH:H₂O 30:60:8 (v/v/v) b) MeOH c) Acetato de sódio 0,2% em metanol e d) Acetato de sódio 0,6% em metanol. Frações correspondentes aos glicolipídios neutros foram eluídas no primeiro solvente e a fração acídica no terceiro solvente. Em seguida, as frações foram secas em evaporador rotatório, à vácuo. Para melhor purificação, a fração acídica dos glicolipídios foi purificada por cromatografia em coluna de Sílica Gel 60, utilizando 5 solventes: a) CHCl_3 :MeOH (8:2, v/v), b) CHCl_3 :MeOH (6:4, v/v), c) CHCl_3 :MeOH (4:6, v/v), d) CHCl_3 :MeOH (2:8, v/v) e e) IPA:HEX: H₂O (55:20:25 v/v/v). O glicolipídio acídico foi eluído no terceiro solvente. A pureza foi verificada por cromatografia em camada fina de alta resolução (HPTLC) desenvolvida no solvente CHCl_3 :MeOH:CaCl₂ 0,02%, nas proporções 60:40:9 (v/v/v). As placas de HPTLC foram borrifadas com primulina em acetona 90% e visualizadas sob luz ultravioleta.

A confirmação se deu pela revelação com 0,5% de orcinol em 3M de ácido sulfúrico (H₂SO₄).

3.5. Produção de anticorpos policlonais

3.5.1 Animais utilizados

Camundongos da linhagem BALB/c, com aproximadamente 6-8 semanas, com peso aproximado de 25 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP).

3.5.2 Imunização dos camundongos

Os camundongos foram imunizados com 4 doses de glicolípido acídico purificado, emulsificado na presença e na ausência de adjuvante incompleto de Freund, seguindo o seguinte protocolo: Os camundongos receberam 50µg/200µl de glicolípido acídico purificado em 4 doses intraperitoneais, iniciando com emulsificação em adjuvante Incompleto de Freund; após 21 dias, receberam mais uma dose do antígeno emulsificado em adjuvante Incompleto de Freund; depois de uma semana, os animais receberam o antígeno sem adição de adjuvante e, na semana seguinte, foram imunizados novamente desta maneira. Foram realizadas sangrias pelo plexo ocular, 24 horas antes de todas as imunizações, para controle dos ensaios. O título de anticorpos foi monitorado através de ELISA e os soros utilizados para produção de anticorpos policlonais foram submetidos à

purificação por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A, de acordo com o fabricante, dialisados e concentrados por meio de sistema AMICON, com membrana de exclusão (“cut-off”) de 10 kDa. A dosagem de anticorpos foi realizada em NanoDrop 1000. As imunizações e produção de anticorpo anti-BSA para o grupo controle foram realizadas da mesma forma. Abaixo, o delineamento do protocolo de imunização acima descrito.

3.5.2.1 SDS-PAGE

Para observar a purificação de IgG obtida por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com o sistema descrito por LAEMMLI (1970). Após a corrida, o gel foi corado com Commassie Brilliant Blue G-250.

3.6. Análise, *in vivo*, da atividade dos anticorpos policlonais

3.6.1 Preparo do inóculo

Células leveduriformes do isolado Pb18 foram incubadas em meio líquido Sabouraud durante 5 dias, sob agitação, a 37°C. A contagem de leveduras foi realizada em Câmara de Neubauer.

3.6.2 Infecção Intratraqueal

Os camundongos foram infectados por via intratraqueal, segundo Taborda e colaboradores (1998), utilizando um inóculo de 3×10^5 leveduras por camundongo. Os animais foram anestesiados com uma solução contendo: 80 mg/kg de Ketamina (Divisão Vetbrands Saúde Animal, Sespo, SP) e 10 mg/kg de Xilazina (Rompun, Bayer do Brasil, SP). Decorridos aproximadamente 10 minutos, os animais anestesiados foram submetidos à infecção através de uma incisão transversal na pele do pescoço, na qual a traquéia foi exposta, e em seguida, com o auxílio de uma seringa de insulina, foi injetada a suspensão fúngica. A sutura foi realizada com auxílio de fio cirúrgico. Após a intervenção cirúrgica, os animais foram mantidos sob fonte moderada de calor, com o objetivo de controlar a hipotermia transitória, causada pela anestesia.

3.6.3 Tratamento

3.6.3.1 *Protocolo Profilático*

Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com 1mg do anticorpo policlonal, 24 horas antes da infecção, e sacrificados 15 e 30 dias após a infecção intratraqueal. Como grupo-controle, foram utilizados animais infectados que receberam 1 mg de anticorpo policlonal anti-BSA, produzido por meio de imunizações sucessivas com albumina de soro bovino (BSA), seguindo o mesmo protocolo para produção de anticorpo policlonal anti-glicolípido ácido. Abaixo, o delineamento do protocolo de tratamento acima descrito.

Tratamento Profilático

3.6.3.2 *Protocolo Terapêutico*

Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com 1 mg dos anticorpos policlonais, 30 dias após infecção e sacrificados aos 45 e 60 dias após infecção intratraqueal. Como grupo-controle, foram utilizados animais infectados que receberam 1 mg de anticorpo policlonal anti-BSA. Abaixo, o delineamento do protocolo de tratamento acima descrito.

Tratamento Terapêutico

3.6.4 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC)

Após 15, 30, 45 e 60 dias de infecção, foi realizado o sacrifício dos animais. Os órgãos (pulmão, baço e fígado) foram retirados, pesados, macerados em 1 ml de PBS estéril e, a partir desta solução, 100 µl foram plaqueados em meio ágar de Infusão de Coração e Cérebro Bovino, “Brain Heart Infusion” (BHI) (Difco - Detroit), suplementado com 4% de soro fetal bovino (SFB), 5% de sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* cepa 192, Estreptomicina e Penicilina (Sigma, St Louis, MO) a 1%, conforme preconizado por Castañeda et al (1988). As placas foram mantidas a 37°C por um período de 7 a 10 dias. O número de colônias foi contado e os resultados expressos em UFC por grama de tecido.

3.6.5 Histopatologia

Após o sacrifício dos animais, amostras de pulmão dos camundongos infectados foram encaminhadas ao Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas, no Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo, fixadas em formalina (MERCK, Alemanha) a

10% para posterior inclusão em parafina, preparação de lâminas e coloração pelo método de Gomori-Grocott.

3.6.6 Detecção e quantificação de citocinas

A detecção das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-4 e TNF- α foi realizada quantitativamente através do método de ELISA de captura (BD OpTeia, San Diego, CA), utilizando como amostra, o sobrenadante de uma fração dos pulmões dos camundongos, macerada em solução contendo inibidor de proteases (Sigma, St Louis, MO). As placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ l dos anticorpos de captura e mantidas por 18 horas a 4 °C. As placas foram lavadas com solução PBS-0,05% Tween 20 e bloqueadas, a temperatura ambiente, com 200 μ l de PBS-10% SFB por poço. Após 1 hora de bloqueio, as placas foram submetidas à nova lavagem e 100 μ l dos padrões (citocinas recombinantes de camundongos) ou das amostras foram adicionados aos poços, com suas respectivas diluições. Incubou-se as placas por duas horas a temperatura ambiente e essas foram novamente lavadas. Foram então adicionados em todos os poços, 100 μ l dos anticorpos de detecção conjugados a Avidina-HRP, e em seguida, as placas foram novamente incubadas por uma hora, a temperatura ambiente. Procedeu-se a última lavagem das placas e em cada poço acrescentou-se o substrato da enzima (TMB - BD Pharmingen). As placas foram incubadas no escuro, a temperatura ambiente, por 30 minutos e em seguida, a reação foi parada pela adição de 50 μ l/poço de H₂SO₄ 2N. A

leitura das absorvâncias foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm.

3.7. Análise, *in vitro*, da atividade dos anticorpos policlonais

3.7.1 Ensaios de fagocitose

Uma monocamada de macrófagos peritoneais da linhagem J774.16 foi obtida através do plaqueamento, em placas de 24 poços, de 200µl de meio RPMI (Cutilab, Brasil) contendo $1,0 \times 10^5$ células e 100 U/ml de IFN- γ , (BD-Pharmigen, EUA). As placas foram incubadas a 37° C em 5% de CO₂, por 24 horas.

Após esse período de incubação, os poços foram lavados com PBS e adicionados às placas o Pb18, na proporção de 1 fungo para 5 macrófagos. Foram adicionados em poços distintos, 20 µl de soro dos camundongos imunizados com o glicolípido ácido, 100 µg/ml dos anticorpos purificados anti-glicolípido ácido e controles (anticorpo policlonal contra BSA).

As placas foram incubadas por períodos de 6,12 e 24 horas, a 37° C em 5% de CO₂. Ao final desse período, os poços foram lavados com RPMI, e para retirada das leveduras aderidas e não internalizadas, os poços foram lavados com α -metil-manopiranosídeo 0,15M. Após as lavagens, o sobrenadante foi recolhido para posterior dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess. Os poços foram lavados com PBS e em seguida adicionamos 500 µl/poço de metanol frio, sendo mantidos por 30 minutos em temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS, foram adicionados aos poços, 50 µl de Giemsa diluído 1:20. O índice fagocítico foi determinado

através da contagem das células em um microscópio óptico, seguindo a fórmula descrita abaixo:

Índice de fagocitose

O índice de fagocitose foi determinado através da seguinte fórmula:

$$PI = P \times F$$

P = número médio de macrófagos fagocíticos

F = número médio de leveduras internalizadas

Um número mínimo de 200 células foi observado para a realização dos cálculos.

3.7.2 Ensaio de viabilidade celular - “*Killing assay*”

O mesmo experimento descrito para fagocitose, nas mesmas condições, foi usado para verificar a viabilidade das células fúngicas (*killing assay*). Após o período de incubação do ensaio e logo após a lavagem com α -metil manopiranosídeo 0,15M, os poços incubados com as células leveduriformes, macrófagos e os anticorpos foram lavados com água destilada estéril com o objetivo de lisar os macrófagos. As células foram plaqueadas em meio Ágar de Infusão de Coração e Cérebro Bovino, “*Brain Heart Infusion*” (BHI), suplementado com 4% de soro fetal bovino, 5% de sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* cepa 192, avirulenta, estreptomicina e penicilina a 1%, conforme preconizado por Castañeda e colaboradores (1988), e incubadas a 37 °C. Decorridos 10 dias de incubação, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado.

3.7.3 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

Amostras de sobrenadantes do ensaio de fagocitose foram colocadas, em triplicata, em placas de 96 poços e, como padrão, foi utilizada uma solução de NaNO_2 em diferentes concentrações (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625 μM). Foram adicionadas às amostras e ao padrão, 50 μl de reagente de Griess (0,1% N-1 naftil-etil-enediamina, 1% sulfanilamida, 2,5% de ácido fosfórico). A absorbância foi determinada por leitor de ELISA (Labsystems iEMS Analyser, Helsinki) com filtro de 550 nm. A quantidade de NO nas amostras foi calculada utilizando-se, como referência, a curva-padrão de nitrito de sódio.

3.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA) e a análise de variância (ANOVA) foi realizada seguida do pós-teste de Tukey. O resultado foi considerado significativo quando o $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Preparação das células de *P. brasiliensis* para a extração do lipídio bruto

Para a extração do lipídio bruto, leveduras de *P. brasiliensis* foram cultivadas em caldo Sabouraud enriquecido com extrato de levedura, sob agitação constante e temperatura de 37°C, com o objetivo de aumentar a massa celular sem interferir em sua composição. Após o período de crescimento, as células foram delipidadas com solventes orgânicos, obedecendo aos três protocolos detalhados no item 3, e obtendo melhor resultado de extração de lipídio bruto total conforme descrito no terceiro protocolo, no qual a massa celular foi delipidada 4 vezes com isopropanol:hexano:água, na proporção 55:20:25 (v/v/v) e 1 vez com CHCl₃:MeOH (clorofórmio/metanol), na proporção 2:1 (v/v) e macerada em homogeneizador manual (Omni-mixer). O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório, à vácuo.

4.2. Extração de glicolipídios acídicos de *P. brasiliensis*

Para a purificação de glicolipídios acídicos, o extrato lipídico bruto foi submetido à cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-25, como descrito anteriormente. A eluição das amostras foi realizada por diferentes

protocolos, a fim de buscar melhores resultados de purificação. Foi possível padronizar a purificação por meio do segundo protocolo, em que a fração acídica dos glicolipídios foi purificada por cromatografia em coluna de Sílica Gel 60, utilizando 5 solventes: a) $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (8:2, v/v), b) $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (6:4, v/v), c) $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (4:6, v/v), d) $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (2:8, v/v) e e) IPA:HEX:H₂O (55:20:25 v/v/v). A fração acídica foi eluída no terceiro solvente. A pureza foi verificada por cromatografia de alta resolução (HPTLC), como pode ser observado na Figura 1. Para comparação da mobilidade cromatográfica, foi utilizado um padrão de glicolipídio da fase neutra (CMH) e um padrão de glicolipídios acídicos, cedidos gentilmente pela Dra. Márcia Ribeiro Pinto e pelo Dr. Gil Benard, respectivamente.

Figura 1. Cromatografia em camada de alta resolução (HPTLC) de glicolipídios acídicos purificado a partir do extrato lipídico bruto de *P. brasiliensis*. A placa de HPTLC foi borrifada com primulina em acetona 90% e visualizada sob luz ultra-violeta (A). A confirmação se deu pela revelação com 0,5% de orcinol em 3M de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (B). Os glicolipídios apresentam um padrão de cor roxa. (1) Padrão CMH; (2) Padrão Acídico; (3) Glicolipídio acídico purificado.

4.3. Produção de anticorpos policlonais

4.3.1 Imunização dos camundongos com glicolipídios acídicos purificados

O soro dos animais imunizados foram semi-quantitativamente analisados pelo método de ELISA e utilizados para produção de anticorpos policlonais por meio de purificação por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A. Para observarmos o perfil da purificação de anticorpos policlonais contra os glicolipídios acídicos, por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A, foi realizada a técnica de SDS-PAGE. Na Figura 2, é possível observar duas bandas de massa molecular de aproximadamente 50kDa e 25kDa, indicativo de IgG e na Figura 3, SDS-PAGE com o perfil do anticorpo contra BSA (controle). A massa molecular da IgG é de aproximadamente 160 kDa sendo duas cadeias leves de 23-25 kDa cada e duas cadeias pesadas de aproximadamente 53 kDa cada.

Figura 2. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da purificação de anticorpos policlonais contra glicolipídio ácido por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A

Figura 3. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da purificação de anticorpos policlonais contra BSA (controle) por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A

4.4. Análise da atividade, *in vivo*, dos anticorpos policlonais

Os camundongos foram infectados por via intratraqueal, utilizando-se o inóculo de 3×10^5 leveduras por camundongo, e tratados por via intraperitoneal: 1) com 1mg dos anticorpos policlonais, 24 horas antes da infecção, e sacrificados 15 e 30 dias após a infecção. 2) com 1 mg dos anticorpos policlonais 30 dias após infecção e sacrificados aos 45 e 60 dias após infecção intratraqueal. Como grupo-controle, seguindo o mesmo esquema de imunização descrito anteriormente, foram utilizados animais infectados que receberam 1 mg de anticorpo policlonal anti-BSA.

4.4.1 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC)

4.4.1.1 Grupo Tratamento Profilático 15 dias

Após 15 dias de infecção, os animais que receberam tratamento profilático com 1mg de anticorpo policlonal contra glicolipídios acídicos foram sacrificados. Os órgãos (pulmão, baço e fígado) foram retirados, pesados e macerados em PBS e plaqueados em meio BHI suplementado. As placas foram mantidas a 37°C por um período de 7 a 10 dias. O número de colônias foi contado e os resultados expressos em UFC por grama de tecido. Conforme indicado na Figura 4, os anticorpos policlonais contra glicolipídios acídicos reduziram significativamente o número de UFC nos pulmões após 15 dias de infecção e impediram a disseminação do fungo para os outros

órgãos, quando comparado com os animais do grupo controle, que receberam anticorpo policlonal anti-BSA.

Figura 4. Unidades formadoras de colônias dos pulmões (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos BALB/c que receberam 1 mg de anticorpo policlonal contra glicolipídios acídicos e 1 mg de anticorpo policlonal contra BSA (controle) 24 horas antes da infecção com Pb18 e sacrificados após 15 dias. Os valores são significantes em relação ao pulmão dos grupos tratado e não tratado. ** $p < 0,01$

4.4.1.2 Grupo Tratamento Profilático 30 dias

Neste grupo, os animais também receberam tratamento profilático com 1mg de anticorpo policlonal contra glicolipídios acídicos, porém, foram sacrificados 30 dias após a infecção com leveduras de Pb18. Foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia nas placas contendo o macerado de baço, fígado e pulmão. A determinação da carga fúngica, esquematizada na Figura 5, mostrou que houve diminuição significativa das unidades formadoras de colônias nos camundongos tratados com anticorpo policlonal anti-glicolipídios acídicos, em esquema profilático, quando comparada com os animais do grupo controle, que receberam anticorpo policlonal anti-BSA. Não foram detectados fungos no baço e no fígado dos animais infectados.

Figura 5. Unidades formadoras de colônias dos pulmões (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos BALB/c que receberam 1 mg de anticorpo policlonal contra glicolipídios acídicos e 1 mg de anticorpo policlonal contra BSA (controle) 24 horas antes da infecção com Pb18 e sacrificados 30 dias pós-infecção. Os valores são significantes em relação ao pulmão dos grupos tratado e não tratado. * $p < 0,05$

4.4.1.3 Grupo Tratamento Terapêutico 45 dias

Os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras de Pb18 e receberam tratamento com 1mg de anticorpo policlonal contra glicolipídios acídicos 30 dias após e foram sacrificados 45 dias pós-infecção. Foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia nas placas contendo o macerado de baço, fígado e pulmão. A determinação da carga fúngica, esquematizada na Figura 6, revelou diminuição bastante significativa das unidades formadoras de colônias nos camundongos tratados com anticorpo policlonal anti-glicolipídio ácido, quando comparada com os animais do grupo controle, que receberam anticorpo policlonal anti-BSA. Não foram detectados fungos no baço e no fígado dos animais infectados.

Figura 6. Unidades formadoras de colônias dos pulmões (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos BALB/c que receberam 1 mg de anticorpo policlonal contra glicolipídios acídicos e 1 mg de anticorpo policlonal contra BSA (controle) 30 dias após a infecção com Pb18 e sacrificados 45 dias pós-infecção. Os valores são significantes em relação ao pulmão dos grupos tratado e não tratado. *** $p < 0,001$

4.4.1.4 Grupo Tratamento Terapêutico 60 dias

Neste grupo, os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras de Pb18 e também receberam, após 30 dias, tratamento com 1mg de anticorpo policlonal contra glicolipídios acídicos, porém, foram sacrificados 60 dias pós-infecção. Foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia nas placas contendo o macerado de baço, fígado e pulmão. A determinação da carga fúngica (Figura 7), mostrou que o tratamento com anticorpos policlonais contra glicolipídios acídicos em esquema terapêutico reduziu significativamente o número de UFC nos pulmões após 60 dias de infecção e impediu a disseminação do fungo para os outros órgãos, quando comparado com os animais do grupo controle, que receberam anticorpo policlonal anti-BSA.

Figura 7. Unidades formadoras de colônias dos pulmões (P), baço (B) e fígado (F) de camundongos BALB/c que receberam 1 mg de anticorpo policlonal contra glicolipídios acídicos 30 dias após a infecção com Pb18 e sacrificados 60 dias pós-infecção. Os valores são significantes em relação ao pulmão dos grupos tratado e não tratado. ** $p < 0,01$

4.4.2 Detecção e quantificação de citocinas

A detecção das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ foi realizada quantitativamente pelo método de ELISA, conforme instruções do fabricante (BD-PharMingen), utilizando homogenato de pulmão extraído dos camundongos BALB/c, mantido em solução contendo inibidor de proteases (Sigma).

4.4.2.1 Grupo profilático 15 dias

Neste protocolo, os animais tratados com anticorpo policlonal contra glicolipídios acídicos apresentaram um aumento da citocina pró-inflamatória IFN- γ , quando comparados com o grupo controle. Valores de IL-12 mostram uma diminuição desta citocina em relação ao grupo controle, porém sem significância. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados em relação à citocina pró-inflamatória TNF- α (Figura 8).

A Figura 9 indica os valores das citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10 em pg/ml, onde podemos observar que o grupo de animais que recebeu anticorpo policlonal anti-glicolipídios acídicos apresentou níveis um pouco mais altos dessas citocinas em relação ao controle, porém sem significância estatística.

Figura 8. Quantificação de IFN- γ , IL-12 e TNF- α presentes no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados com anticorpo policlonal anti-glicolipídios ácidos e anti-BSA, 24 horas antes da infecção intratraqueal e sacrificados após 15 dias. A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os valores são significantes em relação ao controle * $p < 0,05$. Os experimentos foram realizados em triplicata

Figura 9. Quantificação de IL-4 e IL-10 presentes no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados 24 horas antes da infecção intratraqueal, com anticorpo policlonal anti-glicolipídios ácidos e anti-BSA (controle) e sacrificados após 15 dias. A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4.2.2 Grupo profilático 30 dias

Após 30 dias de infecção, os animais tratados com anticorpo policlonal contra glicolipídios acídicos não apresentaram diferença significativa nos níveis de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-12 e TNF- α (Figura 10).

Figura 10. Quantificação de IFN- γ , IL-12 e TNF- α presentes no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados 24 horas antes da infecção intratraqueal, com anticorpo policlonal anti-glicolipídios acídicos e anti-BSA (controle) e sacrificados após 30 dias. A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Na Figura 11, são apresentados os valores das citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10, após 30 dias de infecção. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados.

Figura 11. Quantificação de IL-10 e IL-4 presentes no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados 24 horas antes da infecção intratraqueal, com anticorpo policlonal anti-glicolipídio ácido e anti-BSA (controle) e sacrificados após 30 dias. A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4.2.3 Grupo terapêutico 45 dias

No protocolo terapêutico, os animais tratados com anticorpo policlonal anti-glicolipídios ácidos apresentaram um aumento significativo no nível da citocina pró-inflamatória IL-12, porém, não houve diferença estatística para as citocinas IFN- γ e TNF- α , como esquematizado na Figura 12.

Figura 12. Quantificação de IFN- γ , IL-12 e TNF- α presentes no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados com anticorpo policlonal anti-glicolipídios ácidos e anti-BSA 30 dias após infecção intratraqueal e sacrificados após 45 dias. A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores são significantes em relação ao grupo tratado e não tratado, * $p < 0,05$

As citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, também foram analisadas e não houve diferença estatística entre os grupos estudados (Figura 13).

Figura 13. Quantificação de IL-10 e IL-4 presentes no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados com anticorpo policlonal anti-glicolipídios ácidos e anti-BSA 30 dias após infecção intratraqueal e sacrificados após 45 dias. A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4.2.4 Grupo terapêutico 60 dias

Os animais tratados com anticorpo policlonal contra glicolipídios acídicos apresentaram um aumento de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-12, quando comparados com os animais do grupo controle, como demonstrado na Figura 14. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos estudados em relação à citocina TNF- α .

Figura 14. Quantificação de IFN- γ , IL-12 e TNF- α presentes no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados com anticorpo policlonal anti-glicolipídios acídicos e anti-BSA 30 dias após infecção intratraqueal e sacrificados após 60 dias. A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores são significantes em relação ao grupo tratado e não tratado. *p<0,05

Em relação às citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 não foi constatado diferença significativa entre os grupos estudados, como observado na Figura 15.

Figura 15. Quantificação de IL-10 e IL-4 presentes no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados com anticorpo policlonal anti-glicolipídios acídicos e anti-BSA 30 dias após infecção intratraqueal e sacrificados após 60 dias. A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores são significantes em relação ao grupo tratado e não tratado. * $p < 0,05$

4.4.3 Histopatologia

Cortes dos pulmões dos animais estudados foram submetidos à análise histopatológica. Essa análise foi realizada por meio da comparação entre animais controle e animais tratados com anticorpos policlonais anti-glicolipídios acídicos, avaliando a intensidade do infiltrado celular no parênquima pulmonar e presença de granulomas com células fúngicas viáveis em seu interior.

4.4.3.1 Grupo profilático 15 dias

Observa-se, na Figura 16, a comparação histopatológica de lâminas coradas por Grocott entre os grupos estudados. Os animais do grupo controle, infectados e tratados com anticorpo policlonal contra BSA, apresentaram um parênquima pulmonar com número significativo de células inflamatórias e muito comprometido, com granulomas contendo muitas células fúngicas em seu interior. Os pulmões dos animais tratados com anticorpo policlonal anti-glicolipídios acídicos 24h antes da infecção apresentaram o parênquima menos comprometido, com menor grau de inflamação, apenas alguns granulomas contendo poucas células fúngicas viáveis.

Figura 16. Comparação histológica dos pulmões de camundongos BALB/c infectados e tratados com anticorpos policlonais 24 horas antes da infecção e sacrificados após 15 dias. As fotos foram tiradas utilizando-se objetiva de 10x. A1 – animais do grupo controle (BSA) – Aumento 100x. A2 - animais do grupo controle (BSA) – Aumento 400x. B1 – animais tratados com anticorpo anti-glicolipídios ácidos – Aumento 100x. B2 - animais tratados com anticorpo anti-glicolipídios ácidos – Aumento 400x. Lâminas coradas por Grocott.

4.4.3.2 Grupo profilático 30 dias

Nesse grupo, foi observado um padrão semelhante ao que ocorreu com o grupo profilático de 15 dias. No histopatológico do grupo controle (figuras A1 e A2) tratado com anticorpo contra BSA, foi observado um número elevado de leveduras viáveis e presença de granulomas frouxos. O grupo tratado com anticorpo contra glicolipídios ácidos apresentou parênquima mais conservado e, apesar de ainda ser possível encontrar

granuloma contendo células fúngicas, poucas dessas células parecem viáveis (Figura 17).

Figura 17. Comparação histológica dos pulmões de camundongos BALB/c infectados e tratados com anticorpos policlonais 24 horas antes da infecção e sacrificados após 30 dias. As fotos foram tiradas utilizando-se objetiva de 10x. A1 – animais do grupo controle (BSA) – Aumento 100x. A2 - animais do grupo controle (BSA) – Aumento 400x. B1 – animais tratados com anticorpo anti-glicolipídios ácidos – Aumento 100x. B2 - animais tratados com anticorpo anti-glicolipídios ácidos – Aumento 400x. Lâminas coradas por Grocott.

4.4.3.3 Grupo terapêutico 45 dias

Na Figura 18, podemos observar a comparação histológica entre o grupo controle (BSA) e o grupo tratado com anticorpo contra glicolipídios ácidos, 30 dias após a infecção com *P. brasiliensis* e sacrificados após 45 dias. No grupo controle observamos um parênquima comprometido, com áreas de inflamação e granulomas contendo muitas células fúngicas. O

grupo que recebeu 1mg de anticorpo policlonal contra glicolipídios apresentou um tecido pulmonar bem conservado com poucos granulomas e menor grau de inflamação, além de poucas leveduras viáveis.

Figura 18. Comparação histológica dos pulmões de camundongos BALB/c infectados e tratados com anticorpos policlonais 30 dias após a infecção por *P. brasiliensis* e sacrificados com 45 dias de infecção. As fotos foram tiradas utilizando-se objetiva de 10x. A1 – animais do grupo controle (BSA) – Aumento 100x. A2 - animais do grupo controle (BSA) – Aumento 400x. B1 – animais tratados com anticorpo anti-glicolipídios acídicos – Aumento 100x. B2 - animais tratados com anticorpo anti-glicolipídios acídicos – Aumento 400x. Lâminas coradas por Grocott.

4.4.3.4 Grupo terapêutico 60 dias

Neste último grupo, ainda foi observada a presença de granulomas e comprometimento do parênquima pulmonar, apesar do longo tempo de infecção (60 dias). O grupo controle apresentou danos maiores nos tecidos, presença de granulomas frouxos e número mais elevado de leveduras, em

relação ao grupo que recebeu anticorpo policlonal contra glicolipídios acídicos, porém, menor presença de leveduras, quando comparado aos grupos de 15, 30 e 45 dias.

Figura 19. Comparação histológica dos pulmões de camundongos BALB/c infectados e tratados com anticorpos policlonais 30 dias após infecção por *P. brasiliensis* e sacrificados com 60 dias de infecção. As fotos foram tiradas utilizando-se objetiva de 10x. A1 – animais do grupo controle (BSA) – Aumento 100x. A2 - animais do grupo controle (BSA) – Aumento 400x. B1 – animais tratados com anticorpo anti-glicolipídios acídicos – Aumento 100x. B2 - animais tratados com anticorpo anti-glicolipídios acídicos – Aumento 400x. Lâminas coradas por Grocott.

4.5. Análise, *in vitro*, da atividade dos anticorpos policlonais

4.5.1 Ensaio de fagocitose

Para avaliarmos a capacidade dos anticorpos policlonais anti-glicolipídios em alterar, *in vitro*, a fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis*, realizamos os ensaios utilizando macrófagos peritoneais da linhagem J774.16 ($1,0 \times 10^5$ células/poço), por um período de incubação de 6, 12 e 24 horas. Os macrófagos foram ativados com IFN- γ (50 U/ml) e incubados com as leveduras de Pb 18 na proporção de 5 macrófagos para 1 levedura, na presença de 100 μ g/ml de anticorpos policlonais contra glicolipídios acídicos purificados por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A, soro de camundongo imunizado com glicolipídios acídicos, extrato de glicolipídios acídicos purificados (100 e 200 μ g/ml) e 100 μ g/ml de anticorpos policlonais contra BSA, como controle.

O índice de fagocitose foi determinado através da seguinte fórmula: $PI = P \times F$ (P = número médio de macrófagos fagocíticos; F = número médio de leveduras internalizadas). Um número mínimo de 200 células foi observado para a realização dos cálculos. Conforme indicado na Figura 20, a adição do anticorpo polyclonal e a opsonização com soro de camundongo imunizado com glicolipídios acídicos aumentou significativamente o índice de fagocitose em relação aos controles.

Figura 20. Ensaio de fagocitose utilizando macrófagos peritoneais. Incubação de 6,12 e 24 horas. Amostras - Controle: anticorpo policlonal contra BSA; 100µg/ml de glicolípido ácido purificado; 200µg/ml de glicolípídios ácidos purificados; soro inativado de camundongo imunizado com glicolípídios ácidos purificados; anticorpo policlonal anti-glicolípídios ácidos. As colunas significam a média de três leituras. Os valores são significativos em relação aos controles, *** $p < 0,001$. # diferença significativa entre o grupo incubado por 6h e 24h, # $p < 0,05$

4.5.2 Ensaio de viabilidade celular “*killing assay*”

Foi realizado o ensaio de viabilidade celular, a fim de verificar a capacidade do anticorpo policlonal contra glicolipídios acídicos em ativar os macrófagos e eliminar a levedura de *P. brasiliensis*. Pode-se observar na Figura 21, que a adição do anticorpo policlonal e a opsonização com soro de camundongo imunizado com glicolipídios acídicos se mostrou eficiente em matar as leveduras que foram internalizadas.

Figura 21. Ensaio de viabilidade celular utilizando macrófagos peritoneais. Incubação de 6,12 e 24 horas. Amostras: anticorpo policlonal contra BSA (controle); 100µg/ml de glicolipídios acídicos purificados; 200µg/ml de glicolipídios acídicos purificados; soro inativado de camundongo imunizado com glicolipídios acídicos purificados; anticorpo policlonal anti-glicolipídios acídicos. As colunas significam a média de três leituras. Os valores são significativos em relação aos controles, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$

4.5.3 Determinação da liberação de Óxido Nítrico (NO)

Foi avaliada a capacidade fungicida dos macrófagos através da dosagem de óxido nítrico (NO). Amostras de sobrenadantes do ensaio de fagocitose foram coletadas e, em seguida, realizadas as dosagens de nitrito através de micro-ensaio com reagente de Griess. Os resultados indicaram que a detecção de nitrito é proporcional ao índice de fagocitose. Foi observado aumento de nitrito principalmente em amostras contendo soro de camundongo imunizado com glicolipídios acídicos purificados e com anticorpo policlonal anti-glicolipídios acídicos nos 3 períodos de incubação (6, 12 e 24 horas).

Figura 22. Determinação da produção de nitrito. Macrófagos peritoneais foram incubados na presença de leveduras Pb18, na presença ou na ausência de anticorpos policlonais contra glicolipídios acídicos por 6, 12 e 24 horas. Após esse período, foi realizada a dosagem de nitrito no sobrenadante de cultura, através de micro-ensaio com reagente de Griess. As barras indicam a média de três leituras. Amostras: Controle: anticorpo policlonal contra BSA; 100µg/ml de glicolipídios acídicos purificados; 200µg/ml de glicolipídios acídicos purificados; soro inativado de camundongo imunizado com glicolipídios acídicos purificados; anticorpo policlonal purificado em cromatografia de afinidade em coluna de proteína A. Os valores são significativos em relação aos controles * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5. Discussão

Desde o primeiro relato da paracoccidioidomicose (PCM), inúmeros estudos têm sido realizados a fim de buscar alternativas ou acelerar o tratamento clássico desta micose, já que a mesma figura entre as principais doenças de comprometimento pulmonar no Brasil e em outros países da América do Sul.

A PCM é uma doença que requer um tratamento desgastante, tanto para o paciente quanto para o sistema público de saúde. As drogas de escolha clínica são eficazes, porém, existem desvantagens como necessidade de longos períodos de tratamento e efeitos colaterais que podem ser graves, como nefrotoxicidade, além de possíveis recidivas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; MARTINEZ, 2004).

Embora a quimioterapia permaneça como o tratamento básico da PCM, a vacinação terapêutica com antígenos fúngicos ou transferência passiva de anticorpos específicos podem estimular o sistema imune e adicionar um efeito protetor à quimioterapia, podendo eventualmente neutralizar esta doença recorrente e reduzir sequelas fibróticas (TRAVASSOS e TABORDA, 2012).

O estabelecimento de terapias baseadas no uso de anticorpos na paracoccidioidomicose ainda requer maiores investigações, uma vez que fatores que influenciam a eficácia dessas terapias ainda não estão bem esclarecidos, devido à complexidade de imunidade mediada por anticorpos.

O objetivo desse trabalho foi buscar informações de antígenos presentes na parede de *P. brasiliensis* estudando a interação destes com a mediação da resposta imune.

A maioria dos estudos envolvendo componentes da parede celular está focada na ativação da resposta imune celular. Alguns trabalhos, contudo, relatam o papel da parede celular na ativação da resposta mediada por anticorpos.

Fungos patogênicos possuem parede celular caracterizada como uma estrutura dinâmica, que participa de vários processos biológicos essenciais à célula. Entre suas funções podemos destacar a determinação do formato da célula, suporte osmótico, proteção física, além de estar relacionada a eventos de sinalização celular, adesão e reprodução (revisado por NIMRICHTER et al., 2005). O reconhecimento do fungo pela célula hospedeira depende de processos multifatoriais, com a participação de vários componentes presentes na parede celular e a sua interação com a célula hospedeira.

A parede celular compreende cerca de 20-30% de peso seco da célula fúngica, sua composição química, estrutura e dimensão variam consideravelmente, dependendo das condições ambientais e/ou de cultivo laboratorial, sendo sua formação, coordenada com o ciclo celular (FUKUDA et al., 2009).

Sua composição química é bastante complexa, constituída principalmente por polissacarídeos ligados ou não a proteínas ou lipídios, polifosfatos e íons inorgânicos formando a matriz de cimentação. Quitina,

glucanas, galactomananas e proteínas são compostos mais frequentes, embora sua quantidade varie entre as diferentes espécies fúngicas (ADAMS, 2004).

Toledo et al. (1995) identificaram monohexosilceramida (CMH) e também glicoesfingolipídicos acídicos das formas de levedura e micélio de *P. brasiliensis*. Ambas as formas contêm um glicolipídio neutro (CMH) e dois glicolipídicos acídicos (Pb-3 e Pb-2), porém o Pb-2 foi encontrado em maior quantidade no micélio do que em levedura.

Em nosso trabalho, foram realizados diversos protocolos para produção de extrato lipídico bruto e principalmente para purificação do glicolipídio acídico, já que alguns protocolos publicados não foram reprodutíveis. Foi necessário alterar os solventes utilizados e o melhor resultado para extração de lipídio bruto total se deu conforme descrito no terceiro protocolo, no qual a massa celular foi macerada em homogeneizador manual por 4 vezes em presença de isopropanol:hexano:água, na proporção 55:20:25 (v/v/v) e 1 vez com CHCl_3 :MeOH (clorofórmio/metanol), na proporção 2:1 (v/v) com (Omni-mixer). Análises cromatográficas do extrato lipídico bruto de *P. brasiliensis* demonstraram a presença de lipídios neutros, fosfolipídios e glicolipídios. Através de cromatografia em DEAE-Sephadex A25 e em coluna de Sílica Gel 60 isolamos os glicolipídios acídicos. A pureza foi verificada por cromatografia em camada de alta resolução (HPTLC). As placas foram borrifadas com primulina em acetona 90% e visualizadas sob luz ultravioleta. A confirmação se deu pela revelação com 0,5% de orcinol em 3M de ácido

sulfúrico (H_2SO_4), documentada na Figura 1, onde podemos observar as duas bandas de glicolipídios acídicos.

Silva (2006) purificou, em nosso laboratório, um extrato lipídico bruto a partir de leveduras de *P. brasiliensis* e detectou, in vivo, a produção de anticorpos que reconheceram, através de ELISA e HPTLC-immunostaining, os lipídios bioativos, como CMH e glicosfingolipídios acídicos, através de ELISA e HPTLC-immunostaining. Neste trabalho, leveduras opsonizadas com soro inativado de camundongos imunizados com extrato lipídico bruto foram internalizadas com mais eficiência pelos macrófagos.

Utilizando anticorpos contra glicolipídios acídicos, purificados em Coluna de Proteína A, demonstramos através do ensaio de fagocitose, com três períodos diferentes de incubação, que houve um aumento significativo da interação entre as leveduras e os macrófagos, favorecendo a internalização. Também foi observado que o aumento da fagocitose foi tempo dependente, uma vez que, houve aumento significativo no número de células internalizadas após 24 horas de incubação, em relação ao período de 6 horas. Paralelamente ao estudo da fagocitose, realizamos o ensaio de viabilidade celular (*killing assay*), a fim de verificar a capacidade do anticorpo policlonal contra glicolipídio acídico em ativar os macrófagos e matar a levedura de *P. brasiliensis*. Observamos que a adição deste anticorpo e a opsonização com soro de camundongo imunizado com glicolipídio acídico foram eficientes em ativar os efeitos microbicidas dos macrófagos, diminuindo drasticamente o número de unidades formadoras de colônia, quando comparados ao controle. Nimrichter e colaboradores (2004)

demonstraram que anticorpos contra CMH interferem na ingestão e morte de conídios de *F. pedrosoi* por macrófagos.

Os macrófagos atuam como células efetoras, destruindo os micro-organismos, através da liberação de NO, H₂O₂ e O₂⁻. A produção de NO pelos macrófagos é regulada por IFN- γ , TNF- α , IL-12 e IL-18, como demonstrado em experimentos com camundongos infectados com *C. neoformans* (KAWAKAMI et al., 1997 e 1999). Complementando os resultados anteriores, quantificamos a síntese de óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura do ensaio de fagocitose. As leituras indicaram que a detecção de nitrito é concordante ao índice de fagocitose. Foi observado aumento de nitrito principalmente em amostras contendo soro de camundongo imunizado com glicolípido ácido purificado e com anticorpo policlonal contra glicolípido ácido nos três períodos de incubação (6, 12 e 24 horas). Com estes resultados, podemos concluir que a fagocitose e a liberação de óxido nítrico pelos macrófagos podem auxiliar na eliminação de fungos internalizados pela célula hospedeira.

O papel dos anticorpos no controle de patógenos é normalmente estabelecido através da relação entre a presença dos anticorpos (endógenos ou administrados passivamente) no soro e a proteção. Essa relação tem sido estudada e a utilização de anticorpos policlonais e monoclonais têm produzido evidências conflitantes a favor e contra (CASADEVALL, 1995).

Na PCM, inicialmente indicava-se que a produção de altos títulos de anticorpos específicos não teria efeito protetor e, sim, representaria um prognóstico ruim da doença (revisado por BIAGIONI et al., 1984; revisado

por CANO et al., 1995). Essas características foram indicativas de que a resposta imune está relacionada com a produção de anticorpos, como as respostas imunes direcionadas para o padrão Th2, que conduzem a um padrão de doença mais grave, e aquelas associadas preferencialmente com a ativação da imunidade celular, direcionadas para o padrão Th1, que conduzem a uma patologia mais branda (revisado por CANO et al., 1995).

Preparações policlonais contêm anticorpos de várias especificidades e isotipos, enquanto que os anticorpos monoclonais (AcM) apresentam apenas um tipo de anticorpo, com especificidade e isotipo definidos. A descoberta da existência de AcM protetores, não-protetores e deletérios sugere que a eficácia dos anticorpos policlonais depende das relativas proporções entre esses grupos de imunoglobulinas (NUSSBAUM et al., 1996).

Nossos ensaios de transferência passiva de anticorpos policlonais contra glicolipídios acídicos demonstraram que o número de UFC dos pulmões dos animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com os anticorpos foi reduzido significativamente em todos os períodos de infecção estudados, tanto com tratamentos profiláticos, quanto terapêuticos, além de evitar a disseminação para os outros órgãos.

O papel da imunidade mediada por anticorpos, na resistência do hospedeiro à doença, não tem sido claramente demonstrada na utilização de soros policlonais. Os anticorpos específicos nessas preparações correspondem a uma parcela muito pequena do total de imunoglobulinas, e diferenças na quantidade de anticorpos, na especificidade e no isotipo

podem explicar por que essas preparações nem sempre conferem proteção (CASADEVALL, 1995). Dados indicam que pacientes com PCM não são deficientes na produção de anticorpos, demonstrando, em muitos casos, imunidade humoral hiperativa com aumento dos níveis de IgG, IgE e IgA no soro, fato indicativo de uma ativação policlonal do sistema (ARANGO e YARZABAL, 1982).

As citocinas dosadas nesse estudo estão relacionadas com dois tipos de resposta imunológica importantes na paracoccidioidomicose, IFN- γ , IL-12 e TNF- α , como representativas de resposta padrão Th1, cuja resposta é considerada protetora e as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, exemplo de resposta padrão Th2, que agravam o quadro da doença. No entanto, dependendo do grau da inflamação gerado pela resposta Th1, as citocinas do padrão Th2 são essenciais para o balanço da resposta imune protetora (revisado por TRAVASSOS et al., 2008).

A dosagem das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-12 apresentaram aumento significativo nos animais tratados com os anticorpos contra os glicolípídios acídicos em relação aos animais controles. Explorando esses padrões de resposta, Kashino et al., (2000) demonstraram que a resistência ao *P. brasiliensis* está relacionada com uma resposta preferencial Th1, enquanto que a suscetibilidade à doença decorre da ausência de IFN- γ . Foi demonstrado que os animais resistentes mantinham elevada síntese de IFN- γ e IL-2, além da secreção predominante de IgG2a. Os animais suscetíveis produziam baixos níveis de IFN- γ , altas concentrações de IL-5 e IL-10, eosinofilia e uma preferencial secreção de

IgG2b e IgA. Não houve diferença nos níveis de TNF- α entre os grupos ensaiados.

A resposta imune frente a infecções por patógenos intracelulares, na presença de citocinas Th1 (IFN- γ e TNF- α), é prioritária para os fenômenos de imunoproteção. Nesse caso, o IFN- γ tem uma multiplicidade de funções, tais como; promover a fagocitose e a morte do micro-organismo e induzir a síntese de IgG2a, que é um fator opsonizante mais eficiente do que IgG1 (Souto et al., 2000).

Em nosso trabalho, não encontramos diferenças significativas nos níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 entre os grupos tratados e os controles.

Nas análises histológicas, ficou evidente a melhoria do tecido pulmonar dos animais dos grupos que receberam tratamentos com anticorpos policlonais contra glicolípídios acídicos, tanto em protocolos profiláticos, quanto terapêuticos. Foi observada diminuição considerável da inflamação no tecido, assim como o número de células fúngicas viáveis. E, apesar de encontrarmos leveduras nos pulmões desses grupos, essas se localizavam interiorizadas em granulomas bem definidos, mostrando que a resposta imune conseguiu conter as células fúngicas, evitando a disseminação para outros órgãos. Essa resposta é característica da forma menos severa da doença, em que apresenta granuloma compacto, com número reduzido de células fúngicas. Os grupos controles apresentaram lesões difusas, com grânulos frouxos, mal organizados, contendo grande quantidade de fungos viáveis em seu interior.

Os mecanismos com os quais os anticorpos específicos medeiam à proteção contra fungos não são bem entendidos. Essas moléculas podem mediar a proteção pelo aumento da eficácia de células efetoras do hospedeiro contra o fungo. Anticorpos específicos podem melhorar a resposta inflamatória por promover a fagocitose e, conseqüentemente, aumentar a apresentação de antígenos e a expressão de moléculas co-estimulatórias (VECCHIARELLI e CASADEVALL, 1998; VECCHIARELLI et al., 1998; MONARI et al., 1999), ou através de ligações cruzadas de receptores de Fc e da modulação da produção de citocinas.

A administração de anticorpos policlonais direcionados aos antígenos de superfície, presentes em abundância na parede celular dos fungos, como tratamento da infecção por *P. brasiliensis* se mostrou promissor. Não ofereceu esterilidade do fungo no hospedeiro, todavia, reforça a necessidade de busca por novas alternativas terapêuticas que colaborem para alcançar esse objetivo.

6. Conclusões

- A padronização do protocolo de purificação de glicolipídios acídicos foi eficaz e possibilitou a produção de anticorpos policlonais contra antígenos de natureza glicolipídica
- Os anticorpos policlonais gerados contra os glicolipídios acídicos foram capazes de **aumentar a atividade fagocítica**, a produção de **óxido nítrico** e **morte** das leveduras de Pb 18, por macrófagos peritoneais *in vitro*
- O anticorpo policlonal contra antígenos glicolipídicos em modelo profilático e terapêutico de PCM experimental, **reduziu a carga fúngica** dos pulmões, além de **evitar a disseminação**
- A transferência passiva deste anticorpo policlonal foi capaz de **reduzir os danos teciduais** dos animais infectados, além de induzir a secreção de **IFN- γ** e **IL-12**, modulando a resposta imune para o padrão Th1 e *clearance* do fungo
- O **anticorpo policlonal contra o glicolipídio ácido** de *Paracoccidioides brasiliensis* mostra-se promissor tanto como **vacina** (modeloprofilático) quanto como **imunomodulador** do tratamento da PCM (modelo terapêutico)

REFERÊNCIAS

Adams, D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 2004;150:2029-35.

Almeida, F. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. *An. Fac. Med. São Paulo*. 1930; 5:125-41.

Almeida IC, Neville DC, Mehlert A, Treumann A, Ferguson MA, Previato JO, et al. Structure of the N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glycobiology*. 1996;6(5):507-15.

Arango M, Oropeza F, Anderson O, Contreras C, Bianco N, Yarzabal L. Circulating immune complexes and in vitro cell reactivity in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 1982;79:153-8.

Bagagli E, Theodoro RC, Bosco SMG, Mcewen JG. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia*, 2008; 165:197-207.

Barbosa W. Paracoccidioidomicose (Blastomicose Sul Americana) In: Amato Neto V, Baldy JLS. *Doenças Transmissíveis*. 3.ed. São Paulo: Sarvier; 1991. p.653-62.

Barreto-Bergter E, Pinto MR, Rodrigues ML. Structure and biological functions of fungal cerebrosides. *An. Acad. Bras. Cienc*. 2004;76:67-84.

Barreto-Bergter E, Pinto MR, Rodrigues ML. Studies in Natural Products Chemistry. *Atta-ur-Rahman* (Ed.) 2006; Elsevier BV.1025.

Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Silva MES, Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *Int. J. Epidemiol*. 2009.

Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 2008;165:209-21.

Benard G, Hong MA, Del Negro GM, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJ. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996;54:7-12.

Benard G, Mendes-Gianini MJ, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJ. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J. Infect. Dis.* 1997;175:263-7.

Bertini S, Colombo AL, Takahashi HK, Straus AH. Expression of Antibodies Directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of paracoccidioidomycosis treatment. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007;150-6.

Biagioni L, Souza Mj, Chamma Lg, Mendes Rp, Marques As, Mota Ng, Franco M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1984;78:617-21.

Bittencourt AL, Freire-De-Andrade JA, And Filho SPC. Paracoccidioidomycosis in a four-years-old boy. *Micopathologia*. 1986;93:55-9.

Borges-Walmsley Mi, Chen D, Shu X, Walmsley Ar. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.* 2002;10:80-7.

Brummer, E.; E. Castaneda, A. Restrepo. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993;6:89-117.

Buissa-Filho, R., Puccia R., Marques A. F., Pinto F. A., Muñoz, J. E., Nosanchuk, J. D., Travassos, L. R., Taborda, C. P. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*

mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. *Infection and Immunity*. 2008;76:3321-28.

Calich VI, Vaz Ca, Burger E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol*. 1998;149(4-5):407-17.

Camargo Zp, Franco Mf. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol*. 2000; 17:41-48.

Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CA, Russo M, Calich VL. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. *Infect. Immun*. 1995;63:1777-83.

Carbonell, L. M.; Castejon, H.; Pollak, L. Cytochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis*. Cytochemistry of cytoplasmic polysaccharides in yeast form cultures with light microscope. *J. Histochem. Cytochem*. 1964;12:413-8.

Carrada G, Cañeda C, Salaiza N, Delgado J, Ruiz A, Sanchez B, Gutiérrez-Kobeh L, Aguirre M, Becker I. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania Mexicana*. *Parasite Immunol*. 2007;29(3):117-26.

Casadevall A. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect. Immun*. 1995;63:4211-18.

Castañeda E, Brummer E, Perlman AM, McEwen, JG, Stevens DA. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. *J. Med. Vet. Mycol*. 1988;26:351-8.

Chiarella AP, Arruda C, Pina A, Costa T A, Ferreira RC, Calich VL. The relative importance of CD4+ and CD8+T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infection*. 2007;9:1078-88.

Da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Taborda CP. Melanin in the dimorphic pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microb. Infect.* 2006;8:197-205.

De Almeida SR, de Moraes JZ, de Camargo ZP, Gesztesi JL, Mariano M, Lopes JD. Pattern of immune response to GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol.* 1998;190(1):68-76.

De Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia.* 1971;9(3):248-53.

De Oliveira LL, Coltri KC, Cardoso CR, Roque-Barreira MC, Panunto-Castelo A. T helper 1-inducing adjuvant protects against experimental *Paracoccidioidomycosis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(3):183.

Dromer, F.; Charreire, J.; Contrepolis, A.; Carbon, C.; Yeni, P. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 1987;55:749-52.

Emanuel A, Millington A, Rocha L. *Paracoccidioidomycose*. Análise de uma casuística hospitalar observada num período de 11 anos no Distrito Federal. *An. Bras. Dermatol.* 1983;58:257-60.

Farias M R, Werner J, Muro MD, Marques AS, Marques MEA, Franco MF, Ribeiro MG, Custodio CC, Condas LAZ, Bosco SMG, Bagagli E. Canine *paracoccidioidomycosis*: case report of generalized lymphadenitis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2005;47(14):64.

Ferreira MS, Freitas LH, Lacaz CS, Del Negro GM, De Melo NT, Garcia NM, et al. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. *J Med Vet Mycol.* 1990;28(3):253-6.

Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Da Silva Lacaz C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol.* 2000;38(3):185-91.

Franco MF, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezzallah-Wasso M, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. *Clinical Tropical medicine and Communicable Disease.* 1989;4:180-96.

Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1986;25:5-18.

Fukuda EK, Vasconcelos AFD, Matias AD, Barbosa AM, Dekker RFH, Silva MLC. Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization. Review. *Ciências Agrárias.* 2009;30:117-34.

Gesuele E. Aislamento de *Paracoccidioides* sp. de heces de pinguino de la Antártida. *IV International Meeting on Paracoccidioidomycosis*, 1989. Caracas.

Giraldo R, Restrepo A, Gutiérrez F, Robledo M, Londoño F, Hernández H, et al. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. *Mycopathol.* 1976;58:63-70.

Goldani LZ, Picard M, Sugar AM. Synthesis of heat-shock proteins in mycelia and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Microbiol.* 1994;40(2):124-8.

Greer DI, Restrepo A. La epidemiologi de la paracoccidioidomicosos. *Bol Of. Sanit. Panam.* 1977;83:428-45.

Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia. *Sabouraudia.* 1965;4:124-5.

Hahn RC, Morato-Conceicao YT, Santos NL, Ferreira JF, Amdan JS. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses*. 2003;46(8):342-7.

Han Y, Cutler JE. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun*. 1995;63:2714-9.

Hanna SA, Monteiro Da Silva JL, Giannini MJ. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect*. 2000;2(8):877-84.

Hong M, Zhu Q. Macrophages are activated by 17beta-estradiol: possible permission role in endometriosis. *Exp. Toxicol. Pathol*. 2004;55(5):385-391.

Iwai LK, Yoshida M, Sidney J, Shikanai-Yasuda MA, Goldberg AC, Juliano MA et al. In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* frequently recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized individuals. *Mol. Med*. 2003;9(9-12):209-19.

Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma J, Yamamura Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol*. 1972;110:208-18.

Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE, Rodriguez J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol*. 1969;97:1036-41.

Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CA, Burger E, Singer LM, Calich VL. 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*. 2000;20:89-97.

Kawakami K, Qureshi MH, Koguchi Y, Zhang T, Okamura H, Kurimoto M, Saito A. Role of TNF- α in the induction of fungicidal activity of mouse peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* by IL-12 and IL-18. *Cell. Immunol.* 1999;193:9-16.

Kawakami K, Tohyama M, Qifeng X, Saito A. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase mRNA in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*: effects of interleukin-12. *Infect. Immun.* 1997;65:1307-12.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.

Leverly SB, Toledo MS, Straus AH, Takahashi HK. Structure elucidation of sphingolipids from the mycopathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: an immunodominant beta-galactofuranose residue is carried by a novel glycosylinositol phosphorylceramide antigen. *Biochemistry.* 1998;37(24):8764-75.

Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1983;80:7659-63.

Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hypo-blastomycoses americanas. *Brazil Méd.* 1908;22:141-4.

Mamoni RL, Nouér AS, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera from patients with juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* 2002;40:153-9.

Manocha MS. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparison between the yeast and mycelia forms. *Sabouraudia.* 1980;18:281-6.

Marques AF, Da Silva MB, Juliano MA, Munhoz JE, Travassos LR, Taborda CP. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infect.* 2008;10(12-13):1251-8.

Marques AS, Franco MF, Mendes RP, Silva MCA, Baccili C, Curcelli ED, et al. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1983;25:87-92.

Martinez R. Paracoccidioidomicose. In: SIDRIM, J. J. C; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 204-21.

Matthews R, Hodgetts S, Burnie J. Preliminary assessment of a human recombinant antibody fragment to hsp90 in murine invasive candidiasis. *J. Infect. Dis.* 1995;171:1668-71.

Mattos-Grosso D, Almeida SR, Mariano M, Lopes D. Characterization of gp 70 and anti-gp-70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect. Immun.* 2003;71:6534–42.

Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Niño-Vega G, Taylor JW. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* 2006;23:65-73.

Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and control of cure. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 1994;p.373-392.

Monari C, Kozel TR, Casadevall A, Pietrella D, Palazzetti B, Vecchiarelli A. B7 costimulatory ligand regulates development of the T-cell response to *Cryptococcus neoformans*. *Immunology.* 1999;98(1):27-35.

Mota NGS, Iwasso MTR, Peraçoli MTS, Auri RC, Mendes RP, Marcondes J, Marques SA, Dillon SL, Franco MF. Correlation between mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1985;79:765-72.

Muchmore, H. G.; Mckown, B. A.; Mohr, J. A. Effects of the steroid hormones on the proliferation of *Paracoccidioidomycosis braziliensis*. *Biol. Oficina Sanit. Panam*. 1974;77:55-70.

Mukherjee J, Scharff MD, Casadevall A. Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun*. 1992;60:4534-41.

Negroni P. The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina. *Prensa Med Argent*. 1966;53(39):2381-2.

Negroni RMD. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis, Lutz's Mycosis). *Inter. J. of Dermatology*. 1993;32:847-859.

Nimrichter L, Barreto-Bergter E, Mendonça-Filho RR, Kneipp LF, Mazzi MT, Salve P, Farias SE, Wait R, Alviano CS, Rodrigues ML. A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. *Microbes Infect*. 2004;6(7):657-65.

Nimrichter L, Rodrigues ML, Rodrigues EG, Travassos LR. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes and Infection*. 2005;7:789-98.

Nussbaum G, Yuan R, Casadevall A, Scharff MD. Immunoglobulin G3 blocking antibodies to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J. Exp. Med*. 1996;183:1905-9.

Peraçoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques SA, Soares AM. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by

monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infection*. 2003;5(5):413-8.

Pina A, Saldiva PH, Restrepo LE, Calich VL. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leukoc. Biol*. 2006;79(6):1202-13.

Popi AF, Lopes JD, Mariano M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol*. 2002 Jul-Aug;218(1-2):87-94.

Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 May;104(3):513-21.

Puccia R, Schenkman S, Gorin Pa, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun*. 1986 Jul;53(1):199-206.

Puccia R, Takaoka DT, Travassos LR. Purification of the 43 kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). *J Med Vet Mycol*. 1991;29(1):57-60.

Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol*. 1991 Aug;29(8):1610-5

Restrepo A, Greer DL, Robledo M, Osorio O, Mondragón H Ulceration of the palate caused by a basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Sabouraudia*. 1973 Nov;11(3):201-4.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus

Paracoccidioides brasiliensis: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infec Immun* 1984;46(2):346-53.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*. 1985;23:323-34.

Restrepo BI, McEwen JG, Salazar ME, Restrepo A. Morphological development of the conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *J Med Vet Mycol*. 1986 Aug;24(4):337-9.

Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol*. 2004;42(4):379-83.

San-Blas GE, San-Blas F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A Review. *Mycopathologia*. 1977;62:77-86.

San-Blas G, San-Blas F. Antigenic structure of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Ser*. 1989;47:171-92.

San-Blas G. Paracoccidioidomycosis and its etiological agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol*. 1993;31:99-113.

San-Blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol*. 2002 Jun;40(3):225-42.

Sanford JE, Lupan DM, Schlageter AM, Kozel TR. Passive immunization against *Cryptococcus neoformans* with an isotype-switch family of monoclonal antibodies reactive with cryptococcal polysaccharide. *Infect. Immun*. 1990;58:1919-23.

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 May-Jun;39(3):297-310.

Silva CJ. Lipídios bioativos na paracoccidioidomicose: reconhecimento por anticorpos e interação com macrófagos. 2006. 114 f. [Dissertação-Mestrado]

São Paulo : Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2006.

Silva-Vergara MI, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol.* 1998 Feb;36(1):37-42.

Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.* 2000;156:1811-20.

Suzuki E, Toledo MS, Takahashi HK, Straus AH. A monoclonal antibody directed to terminal residue of beta-galactofuranose of a glycolipid antigen isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*: cross-reactivity with *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi*. *Glycobiology.* 1997 Jun;7(4):463-8

Taborda CP, Juliano CP, Puccia R, Franco M, Travassos LR. Mapping of the T-cell epitope in the major 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 1998;66:786-93.

Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MSS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 2009;52:273–28.

Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco SMG, Macoris SAG, Richini-Pereira VB. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol.* 2007;7:1-8.

Toledo MS, Suzuki E, Straus AH, Takahashi HK. Glycolipids from *Paracoccidioides brasiliensis*. Isolation of a galactofuranose-containing

glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 1995;33(4):247-51.

Toledo Ms, Lavery Sb, Bennion B, Guimaraes LI, Castle Sa, Lindsey R, Momany M, Park C, Straus Ah, Takahashi Hk. Analysis of glycosylinositol phosphorylceramides expressed by the opportunistic mycopathogen *Aspergillus fumigatus*. *J Lipid Res.* 2007 Aug;48(8):1801-24.

Toledo MS, Tagliari L, Susuki E, Silva CM, Straus AH, Takahashi HK. Effect of anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies in pathogenic fungal growth and differentiation. Characterization of monoclonal antibodies MEST-3 direct to Manpa 1- 3 Manpa 2 IPC. *BMC Microbiology.* 2010;10:47.

Travassos LR, Puccia R, Cisalpino P, Taborda C, Rodrigues EG, Rodrigues M, et al. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res.* 1995 Autumn;26(3):297-304.

Travassos, LR, Rodrigues EG, Iwai LK, Taborda CP. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. *Mycopathologia.* 2008;165:341-52.

Travassos LR, Taborda CP, Colombo AL. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2008;6(2):251-62

Travassos LR, Taborda CP. New advances in the development of a vaccine against paracoccidioidomycosis. *Frontiers in Microbiology.* 2012;3:Article 212.

Travassos LR, Taborda CP. Paracoccidioidomycosis: advances in treatment incorporating modulators of the immune response. *J. Invasive Fungal Infect.* 2011;5:1–6.

Vecchiarelli A, Casadevall A. Antibody-mediated effects against *Cryptococcus neoformans*: evidence for interdependency and collaboration between humoral and cellular immunity. *Res. Immunol.* 1998;149:321-33.

Vecchiarelli A, Retini C, Monari C, Casadevall A. Specific antibody to *Cryptococcus neoformans* alters human leukocyte cytokine synthesis and promotes T-cell proliferation. *Infect. Immun.* 1998;66:1244-7.

Vergara MI, Martinez R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 1998;144(3):131-3.

Wanke B, Londero AT, Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, 1994

Xander P, Vigna AF, Feitosa LS, Pugliese L, Bailão AM, Soares CM, Mortara RA, Mariano M, Lopes JD. A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. *Microbes Infect.* 2007;9(12-13):1484-92.

Yarzabal L, Biguet J, Vaucelle T, Andrieu S, Torres JM, Da Luz S. Analisis inmunoquímico de extractos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia.* 1973;11:80-8.