

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Caracterização fenotípica de células dendríticas
transfectadas com scFv obtido a partir de anticorpo monoclonal
anti-idiotípico Ab2- β , que mimetiza o antígeno gp43 de
Paracoccidioides brasiliensis

Grasielle Pereira Jannuzzi

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof^ª. Dra. Karen Spadari Ferreira

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

J34c Jannuzzi, Grasielle Pereira
Caracterização fenotípica de células dendríticas transfectadas com scFv obtido a partir de anticorpo monoclonal anti-idiotípico Ab2- β , que mimetiza o antígeno gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* / Grasielle Pereira Jannuzzi. -- São Paulo, 2013. 75p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Ferreira, Karen Spadari

1. Micologia médica 2. Paracoccidioidomicose : Medicina
3. Imunologia I. T. II. Ferreira, Karen Spadari, orientador.

616.969 CDD

Grasielle Pereira Jannuzzi

Caracterização fenotípica de células dendríticas transfectadas com scFv obtido a partir de anticorpo monoclonal anti-idiotípico Ab2- β , que mimetiza o antígeno gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dra. Karen Spadari Ferreira
Orientador/presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, setembro de 2013

Dedicatória

*Dedico este trabalho a minha família,
pelo incentivo, dedicação e amor*

A Deus, minha prece de agradecimento.

Nem sempre a jornada foi fácil, agradeço a Deus por estar ao meu lado todas as vezes que achei que não seria mais capaz de seguir em frente. Muito Obrigada Senhor pelo dom de amar e ser amada, pela família maravilhosa que me deste, pelos amigos e oportunidades que colocaste em meu caminho.

“Guardá-me, ó Deus, porque em ti confio.” (Salmo 16:1)

À minha família...

À minha avó Lúcia Jannuzzi e ao meu avô José Jannuzzi (in memoriam) que nunca mediram esforços para que eu buscasse meus objetivos, que mesmo sem nenhuma obrigação me criaram e educaram sempre com amor, carinho e dedicação. Vocês sempre serão um exemplo a ser seguido de força, determinação, honestidade e bondade. Obrigada por permitir que eu fizesse parte dessa família linda sem a qual nada seria.

À minha mãe Malen Jannuzzi que sempre esteve disposta a me ajudar, me ouvir, me direcionar tanto em questões profissionais quanto em questões pessoais. Obrigada por ser minha mãe, irmã, amiga e cúmplice nas birutices.

Ao meu irmão Fernando Jannuzzi pelo companheirismo, apoio, pelas verdades que eu precisava/preciso ouvir, pelas “artes” que fizemos, risadas que demos.

Ao meu padrasto Antônio Rodrigues pela pessoa maravilhosa que é. Obrigada por todo carinho, dedicação e por ser meu pai posticho preferido.

Ao meu noivo Rafael Tavares por toda paciência, dedicação e apoio. Obrigada por ser essa pessoa tão especial, que me alegra, me ajuda, me compreende e que me puxa a orelha quando preciso.

Amo todos vocês!!!

Aos amigos do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP...

Nada na vida é tão valioso do que ter pessoas que se pode contar. Essas pessoas são, pelo que muitos dizem, a família que nos permitiram escolher - os amigos.

À Professora Doutora Karen Spadari Ferreira minha profunda gratidão pela oportunidade concedida e pela confiança depositada no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por seu incentivo, pelo longo tempo investido em discussões, ensinamentos ministrados e por sua amizade.

Ao Professor Doutor Sandro Rogério de Almeida por ter cedido espaço em seu laboratório para a realização deste trabalho, pelas valiosas discussões e ensinamentos.

À Hadassa Cristina que desde o começo se mostrou mais que uma amiga, uma verdadeira irmã. Lembro do meu primeiro dia em São Paulo, e você Florzinha me fez sentir em casa com esse jeito hospitaleiro e divertido de ser. E por mais que houvessem brigas, sempre estive ao meu lado quando precisei, e jogue a primeira pedra a irmã que nunca brigou com a outra. Obrigada pela “porta” que me abriu, essa vitória não é apenas minha, é nossa.

À Lavinia Dal’mas que a cada dia veio tornando-se minha amiga, irmã, cúmplice dos fiascos. Obrigada por sua dedicação, pela ajuda nos experimentos, por ouvir as mesmas histórias várias vezes ao dia, pelos passeios na Paulista, pelas doses exacerbadas de açúcar em meio a dieta, por me abrigar em sua casa nos finais de semana, por sua família que já considero minha.

À Pollyanna Martins pelos momentos mais inusitados de risos e choros ao mesmo tempo, pelas conversas, risadas, Piu Piu Coffee e pela amizade.

Ao José Roberto por toda ajuda nos experimentos, longas horas de estudo para as provas. Muito obrigada por seu companheirismo, amizade, por sempre me ajudar quando preciso, mesmo que seja para trocar a maravalha dos animais, pelas gargalhadas, discussões sobre futebol, por ser parceiro de copo, pelas dancinhas e CHUPA Ganso.

À Suelen dos Santos e ao Lucas Gonçalves pelas infinitas discussões, auxílio em técnicas, pelos cafezinhos à tarde, conversas na escada, pelas risadas e companheirismo.

À Karla Santiago, Fábio Seiti, Gilberto Kaihami; pelo companheirismo, ensinamentos, por tornarem a rotina mais divertida

À Soninha pelas longas conversas, puxões de orelha, conselhos, pelos abraços confortantes.

Aos amigos mais novos Roney Pereira e Nicole Araújo com os quais estou aprendendo a compartilhar meus conhecimentos e que me ensinam muitas coisas também.

À Miriam, a japinha mais linda e doce que existe. Obrigada por todas as noites passadas no laboratório, realizando experimentos ou só para não me deixar sozinha.

À Renata Albuquerque que sempre me auxiliou com o citômetro e compartilhou minha alegrias e frustrações com os resultados.

Às meninas do laboratório de Parasitologia que sempre estiveram prontas para me ajudar.

Ao pessoal do laboratório de Microbiologia pela boa e divertida convivência.

À Edna, Sueli e principalmente à Ana Dantas que sempre me auxiliaram em questões burocráticas relacionadas a este trabalho e pela paciência por todas as vezes que as procurei com algum problema ou dúvida.

Agradeço sempre a Deus que permitiu que nossos caminhos se cruzassem e pela oportunidade de conviver com pessoas maravilhosas como vocês.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Jannuzzi, G. P. Caracterização fenotípica de células dendríticas transfectadas com scFv obtido a partir de anticorpo monoclonal anti-idiotípico Ab2- β , que mimetiza o antígeno gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose profunda de natureza granulomatosa, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) e que compromete preferencialmente o tecido pulmonar. O *P. brasiliensis* sintetiza várias substâncias, dentre estas, destaca-se a glicoproteína de 43 kDa (gp43), a qual é considerada o principal componente antigênico do fungo. Dada a importância da gp43, anticorpos monoclonais (Mabs) contra esta glicoproteína foram obtidos e posteriormente caracterizados. Baseado na hipótese da rede idiotípica, Jerne (1974) propôs que cada anticorpo, quando produzido em resposta a um antígeno, induz a formação de outros anticorpos dirigidos contra sua região variável, na qual é única. Anticorpos anti-idiotípicos, que reconhecem o paratopo, contendo a imagem interna do antígeno, são denominados de Ab2- β e seu potencial terapêutico tem sido explorado em diferentes sistemas. Apesar da molécula de anticorpo ser complexa estruturalmente, sabemos que a região Fab, é a responsável pelo mimetismo do antígeno. Então, nosso grupo de pesquisa construiu uma nova molécula de anticorpo à partir do Mab anti-idiotípico Ab2- β , que mimetiza o antígeno gp43 de *P. brasiliensis*, denominada de fragmento variável de cadeia única (scFv). A transfecção dessa molécula em células dendríticas (DCs) mostrou ser promissora na PCM experimental, visto que estes transfectomas foram eficientes em apresentar a proteína scFv às células dos linfonodos, induzindo linfoproliferação, além de diminuir a carga fúngica pulmonar. Visto que a molécula de scFv que possui a região de reconhecimento e ativação de linfócitos T mostrou eficiência no modelo de terapia na PCM experimental, o principal objetivo deste trabalho foi analisar os mecanismos pelos quais os transfectomas de DCs ativam a resposta imune em camundongos infectados com o fungo, para que possamos entender melhor a capacidade destas células em modular a resposta imune na PCM experimental. Dessa maneira, avaliamos a capacidade das DCs transfectadas com pMAC/PS-scFv em migrar para os linfonodos regionais e induzirem uma resposta protetora com produção de IgG, bem como, analisamos o fenótipo destas células e produção de citocinas. Nosso modelo de terapia com pMAC/PS-scFv mostrou-se eficiente, uma vez que observamos diminuição de células T regulatórias nos linfonodos regionais, bem como aumento da produção de citocinas como IFN- γ e IL-12. Ainda, observamos aumento do isotipo IgG2b, sugerindo a modulação de resposta imune para o tipo Th1, importante na proteção da PCM.

Palavras-chaves: Paracoccidioidomicose, células dendríticas e scFv.

Jannuzzi, G. P. Phenotypic characterization of dendritic cells transfected with scFv derived from monoclonal anti- β -idiotypic Ab2 which mimics the antigen gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertation (Masters in Clinical Analysis) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2013.

ABSTRACT

The paracoccidioidomycosis (PCM) is the nature of granulomatous mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) and preferentially compromises lung tissue. The *P. brasiliensis* synthesizes various substances, among these, there is a 43 kDa glycoprotein (gp43), which is considered a major antigenic component of the fungus. Given the importance of gp43 monoclonal antibodies (Mabs) against this glycoprotein were obtained and further characterized. Based on the idiotypic network hypothesis, Jerne (1974) proposed that each antibody, when produced in response to an antigen, induces the several of other antibodies production against its variable region, which is unique. Anti-idiotypic antibodies that recognize the paratope containing the internal image of the antigen are called Ab2 β and their therapeutic potential has been explored in different systems. Although the antibody molecule is structurally complex, we know that the Fab region, is responsible for antigen mimicking. Therefore, our research group has engineered a new molecule from the antibody Mab-anti-idiotypic Ab2 β that mimics the antigen gp43 of *P. brasiliensis*, known as single chain variable fragment (scFv). Transfection of this molecule on dendritic cells (DCs) has shown promise in experimental PCM, since these transfection were effective scFv protein present in the cells of the lymph nodes, inducing lymphoproliferation, in addition to reducing fungal burden in the lung. Since the scFv molecule that has the region recognition and activation of T lymphocytes showed efficiency in therapy model in experimental PCM, the main objective of this study was to analyze the mechanisms by which transfected DCs activate the immune response in infected mice with the fungus, so that we can better understand the ability of these cells to modulate the immune response in experimental PCM. Thus, the capacity of transfected DCs with pMAC / PS-scFv to migrate to regional lymph nodes and induce a protective response with IgG production, as well as analyze the phenotype of these cells and cytokine production. Our therapy model with pMAC / PS-scFv was efficient, since we observed decrease of regulatory T cells in regional lymph nodes, as well as increased production of cytokines such as IFN- γ and IL-12. Furthermore, we observed increased IgG2b isotype, suggesting modulation of the immune response to a Th1 response, the protect model of experimental PCM.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, dendritic cells and scFv.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Relação de anticorpos para fenotipagem de células dendríticas após transfecção, fluorescências e seus respectivos clones.	39
Quadro 2. Relação de anticorpos para fenotipagem de células dendríticas após imunização com transfectomas, fluorescências e seus respectivos clones.....	40
Quadro 3. Relação de anticorpos para fenotipagem de linfócitos após imunização com transfectomas, fluorescências e seus respectivos clones.	41
Quadro 4. Relação de anticorpos para fenotipagem de células dendríticas e linfócitos após tratamento com transfectomas, fluorescências e seus respectivos clones.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de anticorpo antígeno específico que induzem a produção de anticorpo Ab1 contra sua porção variável.	26
Figura 2. Representação esquemática da molécula de scFv.....	28
Figura 3. Representação esquemática da estratégia utilizada para ligação do scFv no vetor pMAC/PS.	34
Figura 4. Imunização com scFv confere proteção em modelo de Paracoccidiodomicose.....	35
Figura 5. Imunização com pMAC/PS-scFv aumenta população de DCs CD11c ⁺ /CD8 ⁺ e CD11c ⁺ /CD40 ⁺ nos linfonodos.....	46
Figura 6. pMAC/PS-scFv induz aumento de células CD3 ⁺ /CD4 ⁺ e CD3 ⁺ /CD8 ⁺ e diminuição de células CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /FoxP3.....	48
Figura 7. Eficiência da transfecção de DCs	50
Figura 8. Ativação de linfócitos T.	52
Figura 9. Ativação de DCs.	53
Figura 10. Terapia com DC–pMAC/PS-scFv induz aumento de citocinas nos linfonodos.....	54
Figura 11. Terapia com DC–pMAC/PS-scFv modula produção de citocinas pulmonares.....	55
Figura 12. Produção de IgG total.	57
Figura 13. Isotipos de IgG.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ab2/Ab3 – Anticorpos anti-idiotípicos

APC – Células apresentadoras de antígeno

BSA – Albumina bovina sérica

B7 – CD80/CD86

CBB – *Coomassie Brilliant Blue*

CCEA - antígeno carcinoembriogênico humano

DCs – Células dendríticas

cDCs – Células dendríticas convencionais

CEEA/FCF – Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

CFA – Antígeno livre da parede do fungo

DC – Célula dendrítica

DC-SING – *Dendritic cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FACS – Separação de Célula pela Atividade de Fluorescência

Fc – Fragmento cristalizável da molécula de imunoglobulina

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FMO – *fluorescence-minus-one*

FSc – Tamanho relativo

GM-CSF – Fator de Crescimento Celular de Monócitos e Granulócitos

gp43 – Glicoproteína de 43 kDa

h – Horas

HBV – Hepatite B

Id - Paratopo

i.t. – Intratraqueal

ICAM – Molécula de Adesão Intracelular

Ig - Imunoglobulina

INF- γ – Interferon-gama

IL- Interleucina

kDa – kiloDalton

LPS – Lipopolissacarídeo

MAbs – Anticorpos monoclonais

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

Pb18 – Cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS – Solução Salina de Fosfato Tamponada

pDCs – Células dendríticas plasmocitóides

PCM – Paracoccidioidomicoses

PE – Ficoeritrina

PI - Iodeto de propídeo

pMAC/PS – Vetor de célula de mamífero

R10 – RPMI com 10% de SFB

rpm – Rotações por minuto

RPMI – Meio de cultura “Roswell Park Memorial Institute – 1640”

scFv - Fragmento variável de cadeia única

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SPF – Padrão sanitário livre de patógenos específicos

SSc – Complexidade relativa

TCR – Receptor de Células T

Th- T Helper (Linfócito T auxiliar)

TLR – Receptores do tipo Toll

TNF- α – Fator alfa de necrose tumoral

TGF- β – Fator de crescimento transformante beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Animais	37
3.2 Fungo.....	37
3.3 Preparação do inóculo	37
3.4 Infecção intratraqueal.....	37
3.5 pMAC/PS - scFv.....	38
3.6 Experimentos <i>in vitro</i>	38
3.6.1 Obtenção e caracterização de células dendríticas.....	38
3.6.2 Transfecção de pMAC/PS-scFv em células dendríticas	38
3.6.3 Análise de moléculas coestimulatórias de DCs após transfecção com pMAC/PS-scFv.....	39
3.7 Experimentos <i>in vivo</i>	39
3.7.1 Imunofenotipagem de células dendríticas recrutadas para os linfonodos após imunização com pMAC/PS-scFv	39
3.7.2 Análise de células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e T reguladoras.....	40
3.7.3 Perfil de células ativadas nos pulmões após imunização com DCs transfectadas (DC-pMAC/PS-scFv)	41
3.7.4 Produção de citocinas e dosagem de IgG total e subtipos após cinética de tratamento com DC-pMAC/PS-scFv	42
3.8 Análise estatística	44
4. RESULTADOS	45
4.1 Análise do perfil de DCs recrutadas para os linfonodos após imunização intramuscular com pMAC/PS-scFv.....	45

4.2	Imunização intramuscular com pMAC/PS-scFv aumenta a população de células T (CD4 ⁺ e CD8 ⁺) e reduz a população de células T regulatórias, nos linfonodos.....	47
4.3	Transfecção de DCs não altera a expressão de moléculas de superfície. 49	
4.4	Terapia com DC-pMAC/PS-scFv induz aumento da população de células T e de DCs ativadas	50
4.5	DCs-pMAc/PS-scFv modula produção de citocinas.....	53
4.6	Terapia com DCs-pMAC/PS-scFv induz produção de anticorpos...55	
5.	DISCUSSÃO	59
6.	CONCLUSÕES	63
7.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	65
8.	ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose profunda de natureza granulomatosa que exibe uma variedade de manifestações clínicas podendo ser pré-determinadas, na maioria das vezes, pela integridade do sistema imunológico, sexo, idade do paciente, sítio da doença e a duração da infecção (LONDERO et al., 1990 e RESTREPO et al., 2009).

A doença compromete primariamente o tecido pulmonar, podendo atingir o sistema linfático, o tecido mucocutâneo e, por contiguidade, qualquer outro órgão. A PCM foi descrita pela primeira vez em 1908 por Lutz, em pacientes que apresentavam granulomas ganglionares e lesões na mucosa oral. Posteriormente, Splendore (1912) documentou em seu trabalho quatro novos casos de PCM, isolou o agente etiológico em cultura e classificou-o como *Zymonema brasiliensis*. Numerosas tentativas para classificar e nomear esse microrganismo foram feitas até que Almeida (1930) criou o novo gênero *Paracoccidioides* e o fungo foi classificado como *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*).

O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico térmico, que quando cultivado á temperatura ambiente de 25°C a 27°C tem crescimento de forma micelial, apresentando colônias de aspecto cotonoso, de crescimento lento e, microscopicamente, apresenta hifas hialinas delgadas e septadas. Na forma de levedura a 35°C- 37°C, o fungo cresce como colônia cerebriforme, que ao exame microscópico pode apresentar formas arredondadas ou ovaladas, de dupla parede refringente, multibrotantes, com aspecto morfológico, característico de roda de leme e com diâmetro variável de 5-30 µm (LACAZ et al., 1991).

O habitat desse fungo ainda permanece obscuro, no entanto, acredita-se que o *P. brasiliensis* habite o solo, uma vez que tal fungo já foi isolado do intestino de tatus selvagens em áreas endêmicas (CADAVID et al., 1993; FRANCO et al., 2000 e RESTREPO et al., 2001). Em trabalhadores agrícolas a alta reatividade em testes cutâneos com a paracoccidiodina indica mais uma vez o solo como fonte de infecção. Um ponto que ajuda a dificultar a investigação do nicho do *P. brasiliensis* é sua capacidade de permanecer por longos períodos em sua forma latente no hospedeiro (FRANCO et al., 1989; LACAZ et al., 2002 e RESTREPO et al., 2008).

Geograficamente, a PCM está distribuída nos países da América Latina (FRANCO et al., 1987). As áreas endêmicas se estendem do México para Argentina, porém a prevalência é maior na América do Sul do que na América Central e nenhum caso foi relatado na Nicarágua e Chile (RESTREPO-MORENO, 1994). O Brasil corresponde a 80% de todos os casos, seguido pela Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina. Na Colômbia é estimado que 9% da população tenham entrado em contato com o fungo. (BONIFAZ, 2010; BRUMMER et al., 1993 e NUCCI, 2009).

Apesar de a PCM ser considerada a terceira maior causadora de morte entre as doenças infecciosas crônicas (WANKE; AIDÊ, 2009), ela não é uma doença de notificação compulsória e dessa forma não se pode calcular ao certo a incidência e prevalência da doença. Contudo, no Brasil estima-se que a taxa de incidência anual seja de 1-3 por 100 000 habitantes e a taxa de mortalidade média de 0,14 por 100 000 habitantes (SHIKANAI-YASUDA, 2006).

Blotta e colaboradores (1999) mostrou que o maior número de casos registrados no Brasil foi na região sudeste, principalmente no estado de São Paulo, seguido pela região sul, principalmente no Paraná, sendo que o maior número de mortes ocorreram em pacientes por volta dos 30 anos de idade com prevalência do sexo masculino.

A PCM acomete principalmente trabalhadores rurais, entre 30 e 50 anos de idade (HORRÉ et al., 2002), podendo levar à morte ou deixar sequelas, causando um significativo impacto socioeconômico (McEWEN et al., 1995). Sua incidência é maior em homens do que em mulheres, na proporção de 13 homens para uma mulher em áreas endêmicas (LACAZ, 1994). Estudos sugerem que os hormônios femininos conferem uma proteção natural contra esta patologia. O tratamento do *P. brasiliensis* com altas concentrações de estrogênio bloqueia a transição da forma miceliana (forma infectante do fungo) para a leveduriforme (forma parasitária) (LOOSE et al., 1983; RESTREPO et al., 1984; SALAZAR et al., 1988 e CLEMONS et al., 1989).

Estudos realizados por Pinzan e colaboradores (2010) mostraram, em modelo animal de castração, a importância de hormônios masculinos e femininos no desenvolvimento e progressão da PCM. Os animais foram infectados intraperitonealmente com o fungo e após 30 dias de infecção, as células de baço dos machos castrados, que foram tratados com estradiol, responderam ao estímulo

com paracoccina, com aumento de produção de IFN- γ e diminuição de IL-10, produzindo um padrão de citocinas semelhante às fêmeas intactas, nas mesmas condições experimentais. Já as fêmeas castradas e tratadas com testosterona tiveram aumento na produção de IL-10 e diminuição de IFN- γ , sendo este um padrão de citocinas liberados por células de machos intactos. Esses dados confirmam o papel importante dos hormônios em determinar susceptibilidade e resistência ao *P. brasiliensis*.

No homem, várias portas de entrada têm sido sugeridas para o *P. brasiliensis*, incluindo pele, mucosas, trato gastrointestinal e pulmões. No entanto, dados experimentais e clínicos suportam a via inalatória como a principal via de entrada deste fungo no hospedeiro humano (McEWEN, 1987). A infecção ocorre pela inalação do fungo na forma de conídio, forma infectante, que posteriormente irá se desenvolver no complexo pulmonar primário. Quando instalado no parênquima pulmonar, o fungo passa para a forma de levedura ou forma parasitária (RESTREPO; MONCADA, 1972).

Quando o hospedeiro é incapaz de inibir o crescimento do fungo ao se contaminar, a micose se dissemina através da via linfática-hematogênica, levando a uma progressão da doença com aparecimento de diversos sinais e sintomas (LACAZ et al., 1959).

As manifestações clínicas estão envolvidas à diversas condições do hospedeiro, como sexo, idade, alcoolismo, tabagismo, integridade do sistema imunológico e fatores genéticos (MONTENEGRO, 1986). Tais manifestações clínicas permitem o direcionamento de duas formas da doença, a PCM-infecção que é caracterizada pela ausência de sinais e sintomas, embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica, evidenciada pela reação tardia do teste intradérmico com paracoccidioidina (LACAZ et al., 1959), como demonstrado em residentes de áreas endêmicas (FAVA; FAVA-NETTO, 1998).

Na PCM-doença, como hospedeiro não têm capacidade de conter o crescimento do fungo, inicia-se o processo de disseminação levando ao início de diversos sinais e sintomas que reúne condições para subdividi-la em dois padrões distintos, a forma aguda/subaguda (tipo juvenil) e a forma progressiva/crônica (tipo adulto), sendo a primeira a forma mais agressiva da doença, enquanto a segunda tem desenvolvimento progressivo e lento (BLOTTA et al., 1999 e RICHINI-PEREIRA, 2009).

A forma aguda/subaguda (tipo juvenil) é habitualmente severa, de evolução rápida (meses), que afeta predominantemente jovens de ambos os sexos (GIRALDO et al., 1976), e está presente em menos de 10% dos casos. O tipo juvenil é considerado uma doença do sistema reticuloendotelial, que pode levar a hipertrofia dos nódulos linfáticos, esplenomegalia e hepatomegalia. A resposta imune celular geralmente é deprimida, embora ocorra aumento da produção de anticorpos específicos (FRANCO, 1986), podendo também ser observado ativação policlonal de células B (OLIVEIRA et al., 2002). Mamoni e colaboradores, em 2002, observaram que pacientes, com essa forma da doença, apresentavam altos títulos de IgG4, IgE e IgA e sugeriram que esses dados em conjunto com a eosinofilia presente (MAMONI et al., 2002) e a alta produção de IL-4 e IL-5 pelos linfócitos desses pacientes (OLIVEIRA et al., 2002) evidenciam um tipo de resposta Th2, que não é uma resposta protetora para PCM (MAMONI et al., 2002). Esta forma é diagnosticada principalmente em crianças desnutridas e em adultos com menos de 30 anos, não havendo diferença entre os sexos (PEREIRA et al., 2004). Geralmente é possível observar lesões na pele (43%) principalmente na região da face, perioral, pescoço, tronco, podendo também ser observada sobre a genitália masculina. Estas lesões podem ser ulceradas ou nodulares e em casos de disseminação extensiva elas têm forma papular ou acneiforme (BLOTTA et al., 1999; LONDERO et al., 1990 e PEREIRA et al., 2004).

A forma progressiva/crônica (tipo adulto) é a mais encontrada, observada em 90% dos casos. Sua instalação é lenta e gradual, sendo observada em pacientes por volta de 35 à 60 anos de idade, com prevalência no sexo masculino (RESTREPO et al., 2008). A apresenta resposta imune humoral com baixos títulos de anticorpos específicos e resposta celular adequada (OLIVEIRA et al., 2002). Paciente com esta forma da doença apresenta altos títulos de IgG1, enquanto os títulos de outros isotipos de Ig permanecem baixos e o mesmo é observado em relação a presença de eosinófilos (MAMONI et al., 2002).

Esta forma da doença parece apresentar reativação endógena, onde a mesma ocorre anos após o contato com o fungo. Tal fato foi observado na Europa, Estados Unidos e Ásia quando pacientes que foram diagnosticados revelaram ter deixado países endêmicos anos antes do começo das manifestações clínicas (MANNNS et al., 1996 e RESTREPO et al., 2008).

Pacientes com a forma progressiva/crônica apresentam danos nos pulmões, podendo ou não estar associada a lesões extrapulmonares com envolvimento adrenal, visceral e na pele (OLIVEIRA et al., 2002). Uma classificação antiga subdivide estes sintomas na forma de lesões unifocal ou multifocal (LACAZ et al., 2002 e LONDERO et al., 1990), porém existem estudos de imagens que têm mostrado que a PCM é uma micose multifocal independente de apresentar ou não sintomas em apenas um órgão (RESTREPO et al., 2008).

Apesar da predominância das lesões pulmonares, os sintomas respiratórios são mínimos, e quando presentes, estão atribuídos a trabalhadores rurais que têm o hábito de fumar (AGUIAR, 2003 e RESTREPO et al., 2008). Os sintomas respiratórios mais encontrados são a tosse produtiva com presença de sangue no escarro (11% dos casos), dispneia podendo evoluir para insuficiência respiratória grave, infiltrados alveolares e intersticiais e lesões fibronodulares que persistem mesmo após o tratamento do fungo (NUCCI et al., 2009; RESTREPO, 2008). O envolvimento do sistema nervoso central é observado em cerca de 15% dos pacientes resultando lesões granulomatosas no parênquima principalmente no hemisfério cerebral, podendo também ser encontrada na espinha medular (ALMEIDA et al., 2004).

A forma de disseminação hematogênica está associada à lesões nos pulmões que podem originar lesões secundárias envolvendo mucosas (intestinal e retal), lesões na mucosa oral e na pele (ALMEIDA, JACKS, SCULLY, 2003; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

O diagnóstico da PCM é realizado através de métodos diretos, histopatológicos e indiretos (diagnóstico sorológico). Os métodos diretos incluem observação microscópica direta dos espécimes biológicos do paciente (pus, escarro, lavado brônquico, biópsia) seguido pelo isolamento do fungo através de cultivo em meio ágar Sabouraud. O teste histopatológico (biópsia de órgão e tecidos) é caracterizado por uma resposta inflamatória representada pela formação de granuloma, que previne a disseminação do fungo. O granuloma é formado por um infiltrado de macrófagos, células gigantes, linfócitos e células epiteliais (RESTREPO; MONCADA, 1974; YARZÁBAL, 1977; FRANCO; FAVA NETTO; CHAMMA, 1973). Quando os órgãos internos são atingidos, os testes sorológicos têm importante valor diagnóstico, entre eles podemos citar imunodifusão (ID), imunoeletoforese, aglutinação em partículas de látex, imunoblot, sendo a ID o principal teste para PCM

devido sua alta sensibilidade e especificidade. Contudo ensaios de ELISA tem sido muito utilizado para diagnóstico sorológico, embora tenha menos especificidade que ensaios de ID, devido a reação cruzada, ele tem alta sensibilidade e é um método rápido e simples (PAGLIARI et al., 2011; CAMARGO, 2008; ALMEIDA, 2007)

O *P. brasiliensis* sintetiza numerosas substâncias (polissacarídeos, proteínas, polipeptídeos, lipídeos e glicoproteínas) que reúnem condições físico-químicas e biológicas para atuarem como antígenos. Kenetsuda e colaboradores (1972), indicaram que a parede celular de *P. brasiliensis* é constituída por polissacarídeos, particularmente α e β -1,3 glucana. A α -1,3-glucana é exclusiva na fase de levedura e a β -1,3-glucana presente na fase de bolor. Somada a estas diferenças bioquímicas encontra-se também a galactomanana, um componente imunogênico presente em maior proporção na fase de bolor, enquanto na fase de levedura são mais encontrados glucosaminas e glicoproteínas.

Em 1977, Yarzabal e colaboradores verificaram que os antígenos liberados no sobrenadante de culturas de *P. brasiliensis* formavam uma banda específica para soros de pacientes com PCM em teste de imunoeletroforese. Esta banda mostrou-se de importância diagnóstica pela especificidade e frequência com que ocorre em soros de pacientes com PCM. Verificou-se, posteriormente, que a banda, denominada de E era composta por 2 componentes, E1 e E2. O antígeno E1, com atividade de fosfatase alcalina era revelado de forma variável, enquanto que o antígeno E2 podia ser visto na imunoeletroforese como sendo específico da PCM. A utilização do antígeno E2, em imunodifusão, permitiu identificar reações específicas com soros de pacientes com PCM.

Em 1986, Puccia e colaboradores investigaram a natureza do antígeno E2. Utilizando filtrados de cultura e cromatografia em coluna de gel filtração, obtiveram três frações (F1, F2 e F3), sendo que apenas a fração F1 mostrou-se imunorreativa em imunodifusão. Esta fração apresentou afinidade para a concanavalina A e, quando eluída desta lectina, imobilizada em coluna de sepharose e analisada em SDS-PAGE, revelou quatro componentes de 43, 55 e 70 kDa e, um componente de alto peso molecular, com migração difusa.

Estudos de imunoprecipitação com soros de pacientes com PCM demonstraram que apenas a glicoproteína com 43 kDa (gp43) era imunoreativa por 100% dos soros de PCM e não reagia com soros normais (PUCCIA et al., 1991a). Posteriormente, verificou-se que a gp43 era o principal componente antigênico

presente nas frações anteriormente descritas por Restrepo e Moncada (1974) e Yarzabal e colaboradores (1977). Desde então, este componente antigênico do fungo, considerado um marcador sorológico da PCM, vem sendo utilizado no sentido de aumentar a especificidade e sensibilidade dos testes sorológicos (CAMARGO et al., 1994).

Várias funções biológicas têm sido propostas para a gp43. Esta glicoproteína é constitutivamente expressa nas fases de micélio e de levedura (GOLDANI et al., 1994) e aparentemente está presente em todos os isolados do fungo analisados (LOPES et al., 1994). Vigna e colaboradores (2006) mostraram um importante papel da gp43 na patogênese do *P. brasiliensis*, quando tal glicoproteína estimulou a formação de um granuloma *in vitro* por células B-1 e macrófagos (VIGNA, 2006). A gp43 está envolvida no mecanismo de instalação da infecção primária, possibilitando o estabelecimento e disseminação de *P. brasiliensis* nos estágios iniciais da infecção realizando, pois ela diminui a capacidade dos macrófagos tanto de realizar fagocitose (POPI; LOPES; MARIANO, 2002) como também em matar o fungo intracelularmente (KONNO et al., 2009).

Dada à importância da gp43, anticorpos monoclonais (MAbs) dirigidos contra esta glicoproteína foram obtidos por Puccia e Travassos (1991b) e posteriormente caracterizados por Gesztes e colaboradores (1996), mostrando que os MAbs anti-gp43 reconhecem porções peptídicas na molécula alvo, uma vez que nenhuma inibição da ligação dos MAbs à gp43 por açúcares pôde ser detectada (GESZTESI et al., 1996). Nenhuma reação cruzada, destes Mabs, foi detectada com antígenos de *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* em ensaios de *immunoblotting*, demonstrando a sua especificidade e sugerindo que esses reagentes poderiam ser empregados na detecção sorológica de PCM (CAMARGO et al., 1994). Além disso, estes MAbs reconhecem a molécula de gp43, em *immunoblotting*, tanto na sua forma íntegra quanto na desglicosilada (38kDa) (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991b; GESZTESI et al., 1996).

Em PCM, demonstraram a existência espontânea da rede idiotípica na resposta imune à gp43 de *P. brasiliensis* em camundongos (SOUZA et al., 1998) e em pacientes (SOUZA et al., 2000) com a doença. No primeiro caso, foi observada a geração espontânea de anticorpos anti-Id (Ab2) e anti-anti-Id (Ab3) em camundongos imunizados com Mabs anti-gp43 (Ab1) e no segundo, a presença de anticorpos anti-Id (Ab2) espontâneos em pacientes com PCM.

De acordo com a hipótese da rede idiotípica proposta por JERNE (1974), todo anticorpo ao ser específico para um determinado antígeno, apresenta características estruturais, funcionais e imunoquímicas próprias que o distingue dos demais anticorpos que compõem o repertório de anticorpos de um mesmo indivíduo. Como os anticorpos não são expressos durante o desenvolvimento fetal, suas sequências da região variável não são reconhecidas como próprias pelo sistema imune. Essas sequências são, portanto, vistas como verdadeiros imunógenos pelo indivíduo que as produz.

Baseado nesse princípio, JERNE (1974) propôs que cada anticorpo, quando produzido em resposta a um antígeno, induz a formação de outros anticorpos dirigidos contra sua região variável, na qual é única. Dessa forma, denominou cada determinante antigênico individual da região variável de Id. Em todo anticorpo existe um Id particular, que corresponde ao sítio de ligação ao antígeno, sendo então, denominado de paratopo. Os anticorpos anti-idiotípicos que reconhecem o Id que compreendem sequências da região variável fora do sítio de ligação ao antígeno são chamados de Ab2 α , enquanto os anticorpos anti-idiotopo, que reconhecem o paratopo, contendo a imagem interna do antígeno, são denominados de Ab2 β .

Os Ab2 β têm grande interesse pelos imunologistas, devido mimetizar o antígeno original, inclusive em suas funções biológicas (**Figura 1**). Já os anticorpos que reconhecem parcialmente o sítio de ligação ao antígeno, são chamados Ab2 γ (BONA; MORAN, 1985).

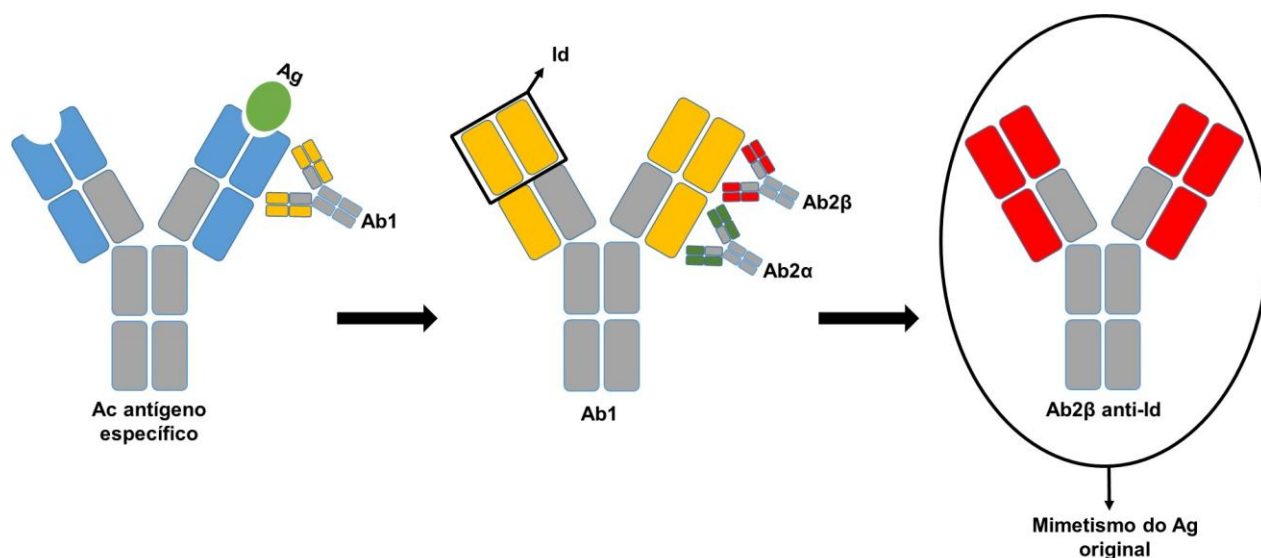


Figura 1. Representação esquemática de anticorpo antígeno específico que induzem a produção de anticorpo Ab1 contra sua porção variável. Os Acs Ab1, por sua vez, induzem a produção de outros Acs contra seu Id, porém com ligações específicas, onde os Ab2 α anti-Id se ligarão em sua região variável fora do sítio de ligação do Ag e os Ab2 β se ligarão na sua porção variável que compreende a porção de ligação ao Ag, sendo estes, reconhecidos pelo sistema imune como verdadeiros Ags.

Devido à complexidade e heterogeneidade das populações de anticorpos formados nos anti-soros convencionais, não foi possível analisar a especificidade fina dos anticorpos anti-Id (Ab2) e anti-anti-Id (Ab3) induzidos pelos Mabs anti-gp43. Portanto, híbridomas foram obtidos a partir de camundongos imunizados com Mab 17c (Ab1), caracterizado anteriormente por Gesztes e colaboradores (1996) como altamente específico para o modelo de PCM, e três híbridomas estáveis Ab2 e quatro Mabs Ab3 foram gerados.

Todos os Mabs Ab2 inibiram (>90%) a ligação da gp43 ao Mab 17c (Ab1) sugerindo que estes Mabs anti-Id ligam-se ao paratopo (ídotipo presente no sítio de ligação ao antígeno) do Mab Ab1, comprovando assim que os Mabs anti-Id obtidos possuem a imagem interna da gp43. Nesse trabalho os autores mostraram que soros de pacientes com PCM reconheceram o Mab Ab2 β 7B12 em substituição a gp43 em ensaio de ELISA, abrindo a possibilidade da utilização desse anticorpo em substituição ao antígeno em ensaios sorológicos.

Em 2004, Souza e colaboradores, utilizando o mesmo Mab Ab2 β (7B12) mostrou que camundongos imunizados com o Ab2 β induziram resposta proliferativa de células T, com produção principalmente de IFN- γ , quando re-estimulados *in vitro* com gp43. Esses resultados comprovaram que o Mab Ab2 β 7B12 possui a imagem interna do antígeno original (gp43) e contém epitopos responsáveis pela ativação de

linfócitos T. Outro resultado importante foi o alto nível de IFN- γ produzido por linfócitos T estimulados com gp43, citocina esta, envolvida na proteção da PCM.

O potencial terapêutico de anticorpos anti-I_d Ab2 β tem sido explorado em diferentes sistemas. Há relatos de produção de anticorpos anti-I_d com funções protetoras contra vírus da hepatite B (HBV), da influenza, da pólio tipo II; bactérias como *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Chlamydia trachomatis*; parasitas como *Trypanosoma rhodesiense* e *Schistosoma mansoni*. Outras aplicações biológicas para o Ab2 β também têm sido propostas, tais como mimetização de hormônios, drogas orgânicas e antígenos associados a tumores (PAN et al., 1995; BONA, 1996; HERLYIN et al., 1996).

Desta forma, dadas às propriedades destes anticorpos anti-I_d, a sua produção mostra-se de grande valor como instrumento de abordagem tanto na elucidação da estrutura do antígeno, quanto no estudo do papel biológico da molécula que eles mimetizam.

O anticorpo é uma molécula grande e complexa estruturalmente. Apesar desta complexidade, sabemos que apenas a região do anticorpo Fab, é o responsável pelo mimetismo do antígeno. Para facilitar a construção de novas moléculas de anticorpos, que reconhecem um epítipo de um antígeno, uma nova categoria de molécula foi criada por engenharia genética: o fragmento variável de cadeia única (scFv do inglês *single chain Fragment variable*).

A construção gênica que codifica este fragmento é obtida por meio da manipulação dos segmentos gênicos que dão origem às cadeias variável leve e pesada de uma determinada imunoglobulina (**Figura 2**). Como a região variável do anticorpo é bem menor em comparação ao gene total, as etapas de clonagem e de construção em vetores de expressão e a expressão propriamente dita são facilitadas. Para que as cadeias leves e pesadas apresentem na molécula de scFv uma conformação funcional, a clonagem é realizada interpondo entre os dois segmentos gênicos codificadores das cadeias variáveis uma sequência codificadora de um peptídeo *linker* hidrofílico e flexível (HUSTON et al., 1991). Este tipo de construção tem se mostrado eficiente para a caracterização de diversos tipos de anticorpos (BRÍGIDO et al., 1993).

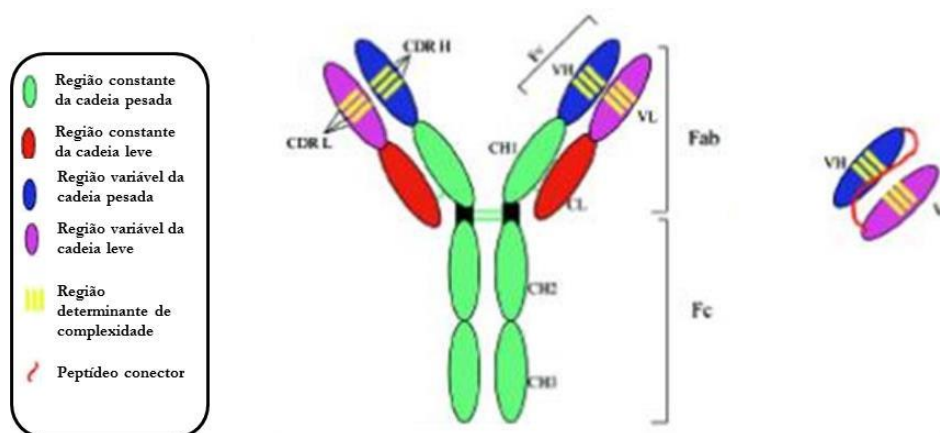


Figura 2. Representação esquemática da molécula de scFv. A molécula de scFv se dá a partir da união da porção gênica variável leve unida a porção gênica variável pesada, do anticorpo, por um peptídeo flexor, que dará mobilidade à molécula.

A construção de scFv a partir de MAb, vem sendo utilizada em vários modelos terapêuticos. Abe e colaboradores (2002), mostraram que o MAb 6G6.C4 mimetiza o antígeno carcinoembriogênico humano (CEA), gerando uma resposta específica para CEA (Ab3) em diversos modelos experimentais. Além disso, scFv de MAb 6G6.C4, está sendo ligado ao gene do GM-CSF (fator estimulador de granulócitos e monócitos) para que este complexo seja utilizado com a finalidade de aumentar a capacidade dessa proteína (scFv Mab 6G6.C4 - GM-CSF) em induzir uma resposta imune específica anti-CEA (resposta de Ab3) mais eficiente (SCHWEGLER et al., 2005).

Alguns autores também utilizam a engenharia genética, com produção de scFv no intuito de melhorar a resposta terapêutica, ou até mesmo, para fins diagnósticos. He e colaboradores (2002), construíram sc-Fv a partir do MAb MC3, presente em carcinomas gástricos. A preparação desse sc-Fv de MC3 solúvel, tornou-se um importante veículo na aplicação terapêutica.

Pignatari e colaboradores (2007), mostraram que a imunização de camundongos com scFv de MAb anti-Id 6.C4 (mimetiza o antígeno CEA) induziram a produção de anticorpos capazes de reconhecerem o antígeno CEA.

Tem sido demonstrado que o Ab2 β é capaz de induzir resposta imune contra o antígeno original apresentado, e que possuem importante função imunorregulatória (BONA, 1996; BETÁKOVA et al., 1998). Em 2008, Johnson e

colaboradores mostraram que o antígeno de melanoma, a gp100 foi fusionada a construção de scFv específico para DEC 205, um receptor de células dendríticas (DCs) foi capaz de reduzir o tumor. Além disso, as DCs foram capazes de apresentar o scFv-DEC205-gp100 tanto por via MHC-I como por MHC-II, alcançando uma vacinação terapêutica eficiente.

A utilização de DCs em ensaios de imunoterapia contra infecções crônicas (D'OSTIANI et al., 2000) e câncer tem sido bem estudada destacando-se como uma metodologia bastante promissora devido sua capacidade de iniciação e regulação das respostas imunes inata e adaptativa (DUBSKY et al., 2007; FUJII et al., 2009; UENO et al., 2010). Além disso, DCs derivadas da medula óssea produzem altos níveis de IL-12, direcionando a resposta de células T para o tipo Th1, a qual está envolvida na resposta imune protetora contra diversas infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias (MACATONIA et al., 1995; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998 e TRINCHIERI, 1998). Em vários modelos de doenças infecciosas, estas células vêm sendo estudadas por sua eficiência em ensaios de imunoterapia e vacinação (D'OSTIANI et al., 2000).

Steinman e Cohn (1973) descreveram as DCs pela primeira vez ao observarem em baço e linfonodos de camundongos, uma população celular diferente das já existentes. Tais células apresentavam forma estrelar com formação de pseudópodos, chamados de dendrítios, e por essa razão foram nomeadas DCs. Em 1978, o mesmo grupo observou um importante papel das DCs no estímulo de células T *naive* (STEINMAN et al., 1978). A partir disso as DCs se tornaram objeto de pesquisa em diversos estudos.

As DCs são células hematopoiéticas e estão distribuídas em todos os órgãos linfóides e não linfóides do corpo, onde sua função principal é de coordenar as respostas imunes inata e adaptativa (BANCHEREAU et al., 2000; STEINMAN, 2003). Já foi visto, *in vivo*, que dependendo da sua forma de ativação, essas células são capazes induzir tolerância ou imunidade de células T (PROBST et al., 2003), bem como a geração de células T regulatórias (YAMAZAKI et al., 2007) e ativação de células *Natural killer* (NK) (HOCHWELLER et al., 2008).

Baseado na capacidade de captura e apresentação de antígenos, as DCs foram classificadas como células apresentadoras de antígenos (APCs). Linfócitos B e macrófagos também fazem parte desse grupo de APCs, porém, as DCs são consideradas “profissionais”, uma vez que são as únicas a migrarem para os órgãos

linfóides secundários para apresentarem o antígeno aos linfócitos T *naive*, fazendo assim o *link* entre a resposta imune inata e adaptativa (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; WICK, 2003).

Após sua descoberta, diversos subtipos de DCs têm sido descritos baseado na sua localização, função e expressão de marcadores de superfície. Embora altos níveis de expressão de CD11c e MHC-II caracterizem a maioria das DCs, estas são definidas de acordo com suas propriedades funcionais em conjunto com marcadores celular (MILOUD et al., 2010).

Existem quatro principais categorias de DCs, as DCs plasmocitóides (pDCs) e as DCs convencionais, as DCs migratórias e as DCs inflamatórias. As pDCs, assim chamadas por sua semelhança morfológica às células plasmáticas, constituem a minoria de DCs espalhadas por todo o corpo. Estão localizadas em órgão linfoides e não linfoides e são caracterizadas pela alta produção de IFN- α em infecções virais e por serem CD11c^{int}B220⁺PDCA-1⁺MCH-II^{int} (VILLADANGOS et al, 2008).

As DCs convencionais (cDCs) ou residentes são caracterizadas por permanecerem apenas no tecido linfoide, durante sua vida e por serem CD11c^{hi}B220⁻MHC-II⁺ (VREMEC et al., 2000). Podem ser subdivididas de acordo com seu fenótipo e função em CD8⁺CD4⁻, que se localizam preferencialmente na zona de células T do baço ou linfonodos (IDOYAGA et al., 2009) e tem como principal função a apresentação cruzada de antígenos via MHC-I (DEN HAAN et al., 2000), ou CD4⁺DC8⁻ que se localizam na polpa vermelha do baço e vênulas endoteliais e zonas marginais dos linfonodos (LIU; NESSENZWEIG, 2010). Apesar de não serem eficientes na apresentação de antígeno por via MHC-I, as CD4⁺DC8⁻ realizam a apresentação de antígeno por via MHC-II (DUDZIAK et al., 2007).

Em tecidos periféricos podemos encontrar as DCs migratórias, que em ambiente com ausência de sinais de inflamação se apresentam de forma imatura expressando altos níveis de CD11c e MHC-II. Ao capturar um antígeno, essas células começam a entrar em processo de maturação que se caracteriza pelo aumento de captura e apresentação de antígeno, começam a expressar CCR7 e moléculas co-estimulatórias em sua superfície. Assim, as DCs CCR7⁺ migram para os linfonodos regionais e iniciam a ativação de células T ou transferem o antígeno para as DCs residentes. (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; ALLAN et al., 2006).

As DCs inflamatórias são geradas a partir de condições inflamatórias, porém pouco se sabe sobre a caracterização destas em termos de fenótipo e função. Como

exemplo dessas células podemos citar um subtipo de DCs produtoras de iNOS/TNF α (DCs-Tip) que foram derivadas de monócitos em baços de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* (SERBINA et al., 2003) e dentro do uroepitélio de camundongos infectados com *Escherichia coli* (ENGEL et al., 2006). As DCs-Tip são muito importantes na resolução de algumas infecções bacterianas (SERBINA et al., 2003), onde se apresentam como CD11c^{int}CD11b^{int}MAC-3^{hi} (SERBINA et al., 2003; ENGEL et al., 2006), embora não seja reconhecida por gerar uma resposta de células T (SERBINA et al., 2003).

Além de poderem ser distinguidas quanto às subpopulações, as DCs podem ser diferenciadas quanto ao seu estado de ativação celular (BELL et al., 1999). As DCs fazem a “ponte” entre a imunidade inata e adaptativa, sendo as únicas com capacidade em capturar o agente nos tecidos periféricos seguido do processamento e apresentação do mesmo pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I ou MCH-II para células T *naive* nos órgão linfoides secundários (revisado por ROY; KLEIN, 2012).

Para que haja o reconhecimento de um antígeno é necessário que haja a interação entre os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) e os padrões moleculares associado ao patógeno (PAMPs) (revisado por ROY; KLEIN, 2012), tais como componente da parede bacteriana (LPS), DNA bacteriano, RNA-dupla fita, sinais pró e anti-inflamatórios (TNF, IL-6, IL-1, IL-10, TGF- β e prostaglandinas), sinais derivados de células T (via CD40L) (BANCHEREAU et al., 2000), e *motifs* de CpG não metilados (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). Dentre os PRRs estão os receptores do tipo *Toll* (TLRs) e os receptores de lectina do tipo C (CLRs), que podem responder individualmente ou sinergicamente (revisado por ROY; KLEIN, 2012), há também os receptores do tipo NOD (NLRs), receptores do tipo RIG (RLRs) (TAKEUCHI; AKIRA., 2010; KAWASAKI; KAWAI; AKIRA, 2011), receptores scavenger como SCARF1 e CD36 (MEANS et al., 2009) que são expressos tanto na superfície das DCs quanto na parte intracelular, dentro de vesículas.

A partir do reconhecimento pelos PRRs, inicia-se uma cascata de sinalização intracelular que leva a indução da maturação das DCs (revisado por ROY; KLEIN, 2012), secreção de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e interferons do tipo I) (revisado por VILLADANGOS; SCHNORRER, 2007), bem como mediação da captura do agente, processamento e apresentação do antígeno (revisado ROY; KLEIN, 2012).

O processo de maturação das DCs inicia-se durante sua migração para os órgãos linfoides secundários, onde as quimiocinas CCL19 e CCL21, presentes constitutivamente nas células epiteliais dos órgãos linfóides secundários, se ligam aos receptores CCR7, recém expressos pelas DCs, e proporcionam o direcionamento das mesmas aos linfonodos e sua fixação nas áreas de células T (Revisado por FOSTER et al., 2008). Neste momento, as DCs diminuem sua capacidade de capturar e processar o antígeno, e aumentam a expressão de moléculas de MHC classe II, co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86) e de adesão (CD54) e aumentam sua produção de IL-12 (GUERMONPREZ et al., 2002), tornando-as ativadoras efetivas de células T *naive* (PALUCKA; BANCHEREAU, 2002).

Nos órgãos linfóides, as células T *naive* circulantes reconhecem peptídeos específicos nas DCs através da ligação aos receptores de célula T (TCRs), que será estabilizada pela interação eficiente entre as moléculas de adesão LFA-1 e CD2 das células T com ICAM-1, ICAM-2 e CD58 das DCs (GUERMONPREZ et al., 2002).

O desenvolvimento predominante de uma subpopulação de células T (Th1 ou Th2) durante uma infecção é extremamente importante, pois certos patógenos são mais efetivamente controlados por uma resposta do tipo celular (Th1) e outros mais efetivamente controlados por uma resposta do tipo humoral (Th2) (SHER; COFFMAN, 1992). Em algumas doenças crônicas, a resposta de células T CD4⁺ inapropriada pode exacerbar a doença, levando a uma incapacidade do hospedeiro para erradicar o microrganismo.

Em 1986 Mossman e Coffman mostraram que as células T CD4⁺ não são uma única população de células T, mas sim uma série de populações distintas com diferentes funções, e inicialmente as subdiviram em células TCD4⁺ que produziam INF- γ e as que produziam IL-4. Posteriormente observaram que essas células, dependendo do tipo de sinal ou estímulo que sofriam se diferenciavam em fenótipos distintos podendo ser do tipo Th1 ou do tipo Th2, sendo o primeiro direcionado para imunidade de microrganismos intracelulares e o segundo para imunidade de patógenos extracelulares incluindo helmintos.

As respostas do tipo Th1 e do tipo Th2 têm citocinas com funções características que os direcionam na modulação da resposta imune, onde Th1 sintetiza INF- γ que aumenta a atividade microbicida dos macrófagos (SUZUKI et al., 1988) e IL-2 que é precursora de células Th1 de memória (WILLIAMS et al., 2006), e

Th2 que produz diversas citocinas, as quais a IL-4 faz o *feedback* para a diferenciação de células T *naive* em célula Th2 (LE GROS et al., 1990 e SWAIN et al., 1990), IL-5 que desempenha um papel importante no recrutamento de eosinófilos, IL-10 suprime a proliferação de células Th1 (FIORENTINO et al., 1989) e também pode suprimir a função de cDCs (MOORE et al., 2001).

Além da resposta imune celular, sabemos que a resposta humoral também é importante na PCM. Baida e colaboradores (1999), investigaram a relação da resposta humoral contra a gp43 entre pacientes com a forma juvenil e a forma adulta da PCM. Observaram que pacientes com a forma juvenil tinham maiores níveis de IgG anti-gp43 do que pacientes com a forma adulta. Dessa forma eles compararam os níveis das subclasses de IgG entre as duas forma da doença e viram que os níveis de IgG4 se mostravam maiores na forma juvenil do que na adulta e o mesmo não acontecia quanto aos níveis de IgG2. O *switch* da IgG4 é regulado pela produção de IL-4, enquanto que o do isotipo IgG2 é controlado pela produção de INF- γ . Estes resultados demonstram, pela primeira vez, o anticorpo específico IgG4 na resposta imune humoral de pacientes com micose sistêmica e sugerem que a mudança para as subclasses IgG em PCM é regulada por um subconjunto T helper (Th1 ou Th2) do perfil de citocinas dominante.

Mesmo com os diversos mecanismos de ativação e modulação de uma resposta específica, o fungo *P. brasiliensis*, bem como o seu principal componente antigênico (gp43), são capazes de inibi-los, levando a uma ineficiência da resposta imunológica. Em vários modelos de doenças infecciosas, DCs estão sendo estudadas por sua capacidade de servir como adjuvante e vacina mediando proteção contra bactérias, vírus, parasitas ou patógenos fúngicos (MOLL; BERBERICH, 2001).

Mostramos que DCs pulsadas com a molécula gp43 purificada do exo-antígeno de *P. brasiliensis* não se mostrou uma boa metodologia para imunoterapia por induzir uma inibição da maturação dessas células (FERREIRA; ALMEIDA, 2005). Portanto, havia a necessidade da utilização apenas das regiões da molécula envolvida na ativação de linfócitos T e produção de IFN- γ .

Desta forma, em 2011, nosso grupo de pesquisa (FERREIRA et al., 2011) construiu uma molécula de scFv a partir de anticorpos Ab2 β , que mimetizam o antígeno gp43 de *P. brasiliensis*. Posteriormente, realizou a ligação do scFv com o

vetor pMAC/PS, vetor específico para células de mamíferos (<http://www.unb.br/ib/cel/imol/vetor/pMACPS.html>) (**Figura 3**).

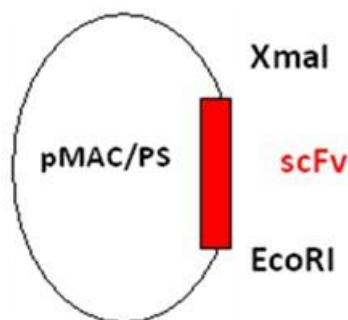


Figura 3. Representação esquemática da estratégia utilizada para ligação do scFv no vetor pMAC/PS. O vetor pMAC/PS foi digerido com as enzimas de restrição *Xma* I e *Eco*RI. A ligação do scFv ao vetor de célula de mamífero foi feito utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase*.

Assim, tal construção plasmidial (pMAC/PS-scFv) foi utilizada na imunização de camundongos, resultando na ativação do sistema imune onde foi observado recrutamento de DCs para os linfonodos regionais (poplíteos e inguinais).

Visto a importância tanto das DCs como de moléculas de DNA em protocolos de vacinação e imunoterapia, o grupo realizou transfecção do pMAC/PS-scFv em DCs e observaram que eram capazes de induzir proliferação (scFv-específica) de células totais dos linfonodos obtidos de camundongos BALB/c, imunizados previamente com tais transfectomas, re-estimulados *in vitro* com o anticorpo anti-gp43 (Ab1).

Em ensaio de imunoterapia, camundongos foram previamente infectados com leveduras virulentas de *P. brasiliensis* e tratados com DC-pMAC/PS-scFv e posteriormente foram avaliados as unidades formadoras de colônias, onde foi visto uma diminuição significativa no crescimento de Pb18 recuperado do pulmão (**Figura 4**). Assim o grupo demonstrou que construção do inserto scFv juntamente com DCs é um modelo promissor de tratamento da PCM experimental.

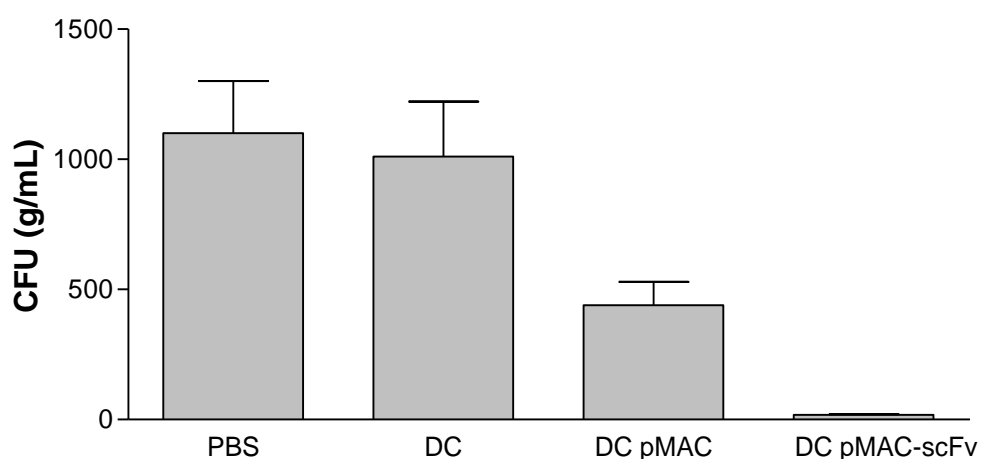


Figura 4. Imunização com scFv confere proteção em modelo de Paracoccidioidomicose. Unidades formadoras de colônias (CFU) do pulmão de camundongos BALB/c infectados com Pb18 por 28 dias e tratados com PBS, DC, DCpMAC ou DC pMAC – scFv nos dias 14 e 21. ** $p < 0,01$ em relação ao controle PBS.

Visto que a molécula de scFv que mimetiza a gp43 de *P. brasiliensis* que possui a região de reconhecimento e ativação de linfócitos T, mostrou eficiência no modelo de terapia na PCM (FERREIRA et al., 2011), o principal objetivo deste trabalho foi analisar os mecanismos pelos quais as DCs foram capazes de ativar a resposta imune em camundongos infectados com o fungo, para que possamos entender melhor a capacidade das DCs em modular a resposta imune na PCM experimental.

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho são:

- Caracterizar a expressão de moléculas de superfície (CD80, CD86, CD40, DEC-205, DC-SIGN, MHC-I e MHC-II) de DCs após transfecção transiente com vetor de expressão (pMAC/PS) contendo o gene do scFv, bem como após tratamento dos camundongos com os transfectomas;
- Determinar o perfil de citocinas produzidas por DCs transfectadas com pMAC/PS-scFv;
- Análise da capacidade de migração de DCs transfectadas com pMAC/PS-scFv para os linfonodos poplíteos e inguinais, bem como análise do perfil de células T ativadas (CD4⁺/CD8⁺);
- Avaliar a capacidade dos transfectomas de DCs em modular a resposta imune *in vitro*, analisando assim, o perfil de citocinas secretadas, bem como o tipo de resposta induzida (Th1/Th2);
- Dosar imunoglobulinas totais, produzidas *in vivo* por camundongos tratados com DCs-scFv;
- Caracterizar o perfil de células pulmonares em camundongos Balb/c infectados co Pb18 e tratados com transfectomas de DCs.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos fêmeas da linhagem BALB/c, com 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram obtidos no Biotério do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram criados em condições SPF (*specific pathogens free*) e alimentados com ração comercial irradiada. Os camundongos foram eutanasiados de acordo com os critérios estabelecidos pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – CEEA/FCF.

3.2 Fungo

Foi utilizada a cepa virulenta Pb18 de *P. brasiliensis* para infecções (KASHINO et al., 1987). A cepa foi mantida em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-ágar (MERCK - Alemanha), em estufa de 37 °C, com repiques semanais.

3.3 Preparação do inóculo

Leveduras da cepa Pb18 foram coletadas em 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), deixando-se decantar as partículas maiores. A suspensão mais leve, contendo células isoladas ou com poucos brotamentos, foi coletada com auxílio de uma seringa de insulina e a contagem do número de células realizada utilizando-se câmara de Neubauer.

3.4 Infecção intratraqueal

O procedimento foi realizado com os animais sob efeito de anestésico, seguindo o esquema: Xilazina (pré-anestésico), Cetamina (anestésico) e PBS na proporção de 3:3:4. Quando os animais já estavam insensíveis à dor foi feita uma pequena incisão longitudinal na pele do pescoço, e a traqueia exposta. Os animais foram infectados com uma suspensão contendo 1×10^6 células/mL de leveduras viáveis de *P. brasiliensis* contidas em 50 μ L de PBS. Após inoculação, a incisão foi suturada e os animais foram colocados sob uma fonte moderada de calor para controlar a hipotermia transitória produzida pela anestesia, até acordarem.

3.5 pMAC/PS - scFv

A molécula de scFv inserida no vetor de célula de mamífero (pMAC/PS) utilizada, é a mesma construída por nosso grupo (FERREIRA, et al., 2011).

3.6 Experimentos *in vitro*

3.6.1 Obtenção e caracterização de células dendríticas

DCs foram obtidas segundo protocolo descrito por Inaba e colaboradores (1992). Células de medula óssea foram retiradas de fêmur e tíbia de camundongos através de diversas lavagens com PBS acrescido de 1 % de albumina bovina (BSA), em seguida as hemácias foram lisadas com tampão hemolítico. As células remanescentes foram cultivadas em meio RPMI contendo 10 % de soro fetal bovino (Cultilab - Campinas – Brasil) e suplementado com GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos) (50 ng/mL) recombinante (Peprotech) por 7 dias na estufa a 37 °C com 5 % de CO₂. No terceiro e quinto dia, as células não aderentes (granulócitos e linfócitos) foram removidas e as células aderentes recultivadas em meio RPMI com GM-CSF recombinante. No sétimo dia de cultura, as células não aderentes, onde se encontram as populações enriquecidas de dendríticas, foram removidas, analisadas através de citometria de fluxo (FacsCanto), para verificação dos marcadores de superfície CD11c e MHC-II, utilizando-se para isso, os anticorpos: anti-CD11c (HL3) e anti-IA/I-E (M5-114.15.2).

3.6.2 Transfecção de pMAC/PS-scFv em células dendríticas

DCs (2×10^5) derivadas da medula óssea foram cultivadas na presença de JetPEI (Polyplus). Estes reagentes são utilizados para transfectar DNA plasmidial em culturas de células *in vitro*. O tratamento com JetPEI altera a membrana plasmática celular, permitindo que ácidos nucleicos atravessem o citoplasma da célula. Para inserirmos o vetor pMAC/PS, contendo ou não o inserto scFv (20 µg/mL), cultivamos as células dendríticas na presença destes reagentes, de acordo com instruções dos fabricantes. Como controle positivo, co-transfectamos as DCs com o vetor que emite fluorescência pNEO-GFP (20 µg/mL). Após 48 horas, analisamos a eficiência de transfecção em microscópio de fluorescência, analisando as células fluorescentes de cada 100 contadas.

3.6.3 Análise de moléculas coestimulatórias de DCs após transfecção com pMAC/PS-scFv.

Após o processo de transfecção com pMAC/PS-scFv em DCs, as mesmas foram ajustadas na concentração de 1×10^6 e marcadas com os seguintes anticorpos fluorescentes: anti-CD11c, anti-MHC-II, anti-CD80, anti-CD86 e anti-CD40 (fluorescências e clones vide **Quadro 1**). Foi realizada análise por citometria de fluxo (FacsCanto) e os dados gerados analisados com auxílio de software FlowJo (TREE STAR, Inc.-USA). Foram analisados 50.000 eventos.

Anticorpo	Fluorescência	Clone
CD11c	FITC/PE	N418
CD80	FITC	B7-1(16-10 A1)
CD86	PE	B7-2(GL1)
CD40	PE	3/23
MHC-II	APC	(MAS-32.1)

Quadro 1. Relação de anticorpos para fenotipagem de células dendríticas após transfecção, fluorescências e seus respectivos clones.

3.7 Experimentos *in vivo*

3.7.1 Imunofenotipagem de células dendríticas recrutadas para os linfonodos após imunização com pMAC/PS-scFv

Camundongos BALB/c (4 por grupo) foram imunizados pela via intramuscular com 20 $\mu\text{g/mL}$ de pMAC/PS-scFv. Como controle, imunizamos os camundongos com PBS 1x ou 20 $\mu\text{g/mL}$ de pMAC/PS. Após 7 dias os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 e os linfonodos regionais, poplíteos e inguinais, retirados e macerados para a obtenção de células. As células foram ajustadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ em 70 μL de PBS com 3 % de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab – Campinas, Brasil). Posteriormente marcadas com: anti-CD11c/anti-MHC-II, anti-CD11c/anti-CD8, anti-CD11c/anti-CD40 e anti-CD11c/anti-DEC-205 (fluorescências e clones vide **Quadro 2**). Após a marcação as células foram lavadas e centrifugadas a 1800 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos. O precipitado celular foi ressuspenso em 250 μL de PBS com 3 % de SFB. Para análise por citometria de

fluxo foi utilizado o aparelho FacsCanto e os dados gerados analisados com auxílio de software FlowJo (TREE STAR, Inc.-USA). Foram analisados 50.000 eventos.

Para distinguir células auto fluorescentes de células que expressam poucas concentrações de marcadores de superfície, utilizou-se a metodologia de *fluorescence-minus-one* (FMO) (ROEDERER et al., 2001). Controles FMO são determinados através da marcação das células com todos os anticorpos/marcadores exceto aquele que será analisado. Os valores obtidos nessa análise são considerados limite FMO, e todos os valores de fluorescência acima deste são considerados verdadeiros positivos. O nível de fluorescência da população de interesse, obtido no canal no qual será medido um determinado marcador revelará a autofluorescência inerente daquela população alvo. Esse valor permite estabelecer um limite com o qual se faz a distinção entre células autofluorescentes e aquelas que expressam um determinante que se ligará ao anticorpo fluorescente usado para detectá-lo (HERZENBERG et al., 2006).

Anticorpo	Fluorescência	Clone
CD11c	FITC/PE	N418
CD8a	FITC	Ly-2(53-6.7)
DEC-205	FITC	NLDC-145
CD40	PE	3/23

Quadro 2. Relação de anticorpos para fenotipagem de células dendríticas após imunização com transfectomas, fluorescências e seus respectivos clones.

3.7.2 Análise de células T CD4⁺, T CD8⁺ e T reguladoras

A metodologia para análise de linfócitos T foi semelhante a empregada para DCs, porém foram usados 7 camundongos por grupo. As células foram ajustadas na concentração de 1×10^6 e as marcações foram feitas da seguinte forma: anti-CD3/anti-CD4, anti-CD3/anti-CD8 e anti-CD3/anti-CD4/anti-FoxP3 (fluorescências e clones vide **Quadro 3**). Foi realizada análise por citometria de fluxo (FacsCanto) e os dados gerados analisados com auxílio de *software FlowJo* (TREE STAR, Inc.-USA). Foram analisados 50.000 eventos.

Anticorpo	Fluorescência	Clone
CD3e	APC	145-2C11
CD3e	PE	145C11
CD4	FITC	L3T4(6K 1.5)
CD8a	APC	53-6.7
FoxP3	PE-Cy5	FJK-16s

Quadro 3. Relação de anticorpos para fenotipagem de linfócitos após imunização com transfectomas, fluorescências e seus respectivos clones.

3.7.3 Perfil de células ativadas nos pulmões após imunização com DCs transfectadas (DC-pMAC/PS-scFv)

Camundongos BALB/c (7/grupo) foram infectados (i.t.) com 1×10^6 leveduras de Pb18 ou com 50 μ L de PBS. Após 7 e 14 dias de infecção, os animais foram tratados em diferentes grupos pela via sub-cutânea: 1) somente PBS (50 μ L); 2) somente DC (1×10^6); 3) DC-pMAC/PS (1×10^6 de DC e 20 μ g/mL de vetor) e 4) DC-pMAC/PS-scFv (1×10^6 de DC e 20 μ g/mL de vetor contendo scFv). Após 7 dias da última imunização, os pulmões foram retirados e macerados em 3 mL de PBS 1x.

As células pulmonares foram purificadas conforme descrito por Gonzalez-Juarrero e Orme (2001). Os animais foram anestesiados e após perfusão do pulmão com 5 mL de PBS contendo 100 U/mL de heparina, o pulmão foi macerado e incubado por 30 minutos a 37 °C na presença de tampão de digestão, contendo 0.7 μ g/mL de colagenase IV (SIGMA – ALDRICH – St. Louis). As partículas maiores foram removidas passando a suspensão de células através de uma membrana de *nylon*. As células totais foram ajustadas na concentração de 2×10^5 /tubo e posteriormente, marcadas com: anti-CD3/anti-CD4, anti-CD3/anti-CD8 e anti-CCR7/anti-CD40 (fluorescências e clones vide **Quadro 4**). A análise foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o aparelhos FACsCanto. Foram analisados 50.000 eventos e os dados adquiridos foram analisados no programa *FlowJo*.

Anticorpo	Fluorescência	Clone
CD11c	FITC/PE	N418
CD4	FITC	L3T4(6K 1.5)
CD3e	PE	1452C11
CD8a	APC	53-6.7
CCR7	PE	4B12
CD40	FITC	(3/23)

Quadro 4. Relação de anticorpos para fenotipagem de células dendríticas e linfócitos após tratamento com transfectomas, fluorescências e seus respectivos clones.

3.7.4 Produção de citocinas e dosagem de IgG total e subtipos após cinética de tratamento com DC-pMAC/PS-scFv

3.7.4.1 Preparação de Antígeno livre da parede do fungo (CFA) de *P. brasiliensis*

O fungo *P. brasiliensis* (cepa Pb 18) foi dissolvido em 10 mL de PBS e agitado em vortex. Posteriormente, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm, e então, o sobrenadante foi recolhido para obtenção do antígeno CFA.

3.7.4.2 Dosagem de proteínas

A concentração do CFA foi realizada segundo método proposto por Bradford (1976), que utiliza *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 (Sigma – St. Louis – Estados Unidos) como reativo e BSA 1,0 mg/mL como padrão.

3.7.4.3 Ensaio de tratamento para determinação de citocinas

Camundongos BALB/c (7/grupo) foram infectados com 1×10^6 leveduras de Pb18. Após 7 e 14 dias de infecção, os animais foram tratados em diferentes grupos pela via sub-cutânea: 1) somente PBS (50 μ L); 2) somente DC (1×10^6); 3) DC-pMAC/PS (1×10^6 de DC e 20 μ g/mL de vetor) e 4) DC-pMAC/PS-scFv (1×10^6 de DC e 20 μ g/mL de vetor contendo scFv). Após 7 dias da última imunização, os pulmões e os linfonodos regionais (axilares e paratímicos) foram retirados e macerados em 3 e 1 mL (respectivamente) de PBS 1x. As células totais dos pulmões e dos linfonodos foram retiradas (como descrito anteriormente) e cultivadas, separadamente, em

estufa a 37 °C com 5 % de CO₂, na proporção de 1x10⁶ células/mL. Após 24 horas, os sobrenadantes foram recolhidos e utilizados na dosagem de citocinas (IL-12, IL-4 e IFN-γ) por ELISA, contra o CFA, de acordo com as recomendações do fabricante eBioscience, Inc.

3.7.4.4 Dosagem de imunoglobulinas IgG e isotipos após ensaio de tratamento

O mesmo modelo de tratamento utilizado para análise de citocinas foi empregado para a dosagem de IgG total e os isotipos IgG1a e igG2b, porém após 7, 14 e 21 dias de infecção foi obtido o soro dos camundongos.

A dosagem de IgG total foi realizada por ELISA, contra o CFA nas concentrações de 2 e 4 µg/mL e gp43 na concentração de 20 µg/mL, todos diluídos em tampão carbonato (Na₂CO₃ 0,795 g, NaHCO₃ em 500 mL de H₂O destilada). Os isotipos, foram dosados na presença de 4 µg/mL de CFA, diluído com o mesmo tampão anteriormente descrito. As placas foram incubada *overnight* em temperatura ambiente (TA). Após o tempo de incubação, realizamos 3 lavagens com PBS-Tween 20, seguido da adição de 200 µL da solução de bloqueio PBS-leite-BSA (PBS + 5 % de leite Molico + 2,5 % BSA). Incubamos a 37 °C por 2 horas. Posteriormente desprezamos a solução de bloqueio e, sem lavar as placas, adicionamos o soro dos animais (para a dosagem de IgG, o soro foi diluído na proporção de 1:10 e 1:50, enquanto o soro para a dosagem dos isotipos, foram diluídos na proporção de 1:25, sendo as todas diluições feitas em PBS-leite). Incubamos a TA por 1 hora. Em seguida lavamos as placas 3 vezes com PBS-Tween 20 e adicionamos 50 µL do anticorpo conjugado previamente titulado (anti mouse IgG-peroxidase) e diluído em PBS-leite-BSA. Incubamos a TA por 1 hora, e após a incubação, lavamos as placas 3 vezes com PBS-Tween 20 e adicionamos 100 µL/poço da solução revelação (1 mg/mL de OPD em tampão citrato-fosfato – Na₂HPO₄.12H₂O 3,68 g, ácido cítrico 1,16 g, H₂O 200 mL, ajustar o pH para 5,3). Incubamos por 15 minutos no escuro, posteriormente paramos a reação com 50 µL/poço de H₂SO₄ 4N. A leitura foi realizada no leitor de ELISA com o filtro de 492 nm.

3.8 Análise estatística

A análise estatística aplicada aos resultados foi feita através de *One-Way* ANOVA, e múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Tukey (ZAR, 1984).

4. RESULTADOS

4.1 Análise do perfil de DCs recrutadas para os linfonodos após imunização intramuscular com pMAC/PS-scFv.

Para analisarmos o perfil da população de DCs recrutadas nos linfonodos após tratamento com a nossa proteína de interesse, camundongos BALB/c foram imunizados intramuscularmente com PBS, pMAC/PS ou pMAC/PS-scFv. Após 7 dias foi realizada a obtenção dos linfonodos poplíteos e inguinais e as células totais foram marcadas com anti-CD11c, anti-CD8, anti-CD40 e anti-DEC-205. Como mostra a figura 1, observamos aumento da população de DCs CD11c⁺/CD8⁺ e CD11c⁺/CD40⁺ nos animais imunizados com pMAC/PS-scFv, em relação aos controles. No entanto, não observamos diferença na expressão de CD11c⁺/DEC-205⁺, entre as diferentes imunizações, como visto na figura 4. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo (FacsCanto) e os dados analisados pelo *software FlowJo*.

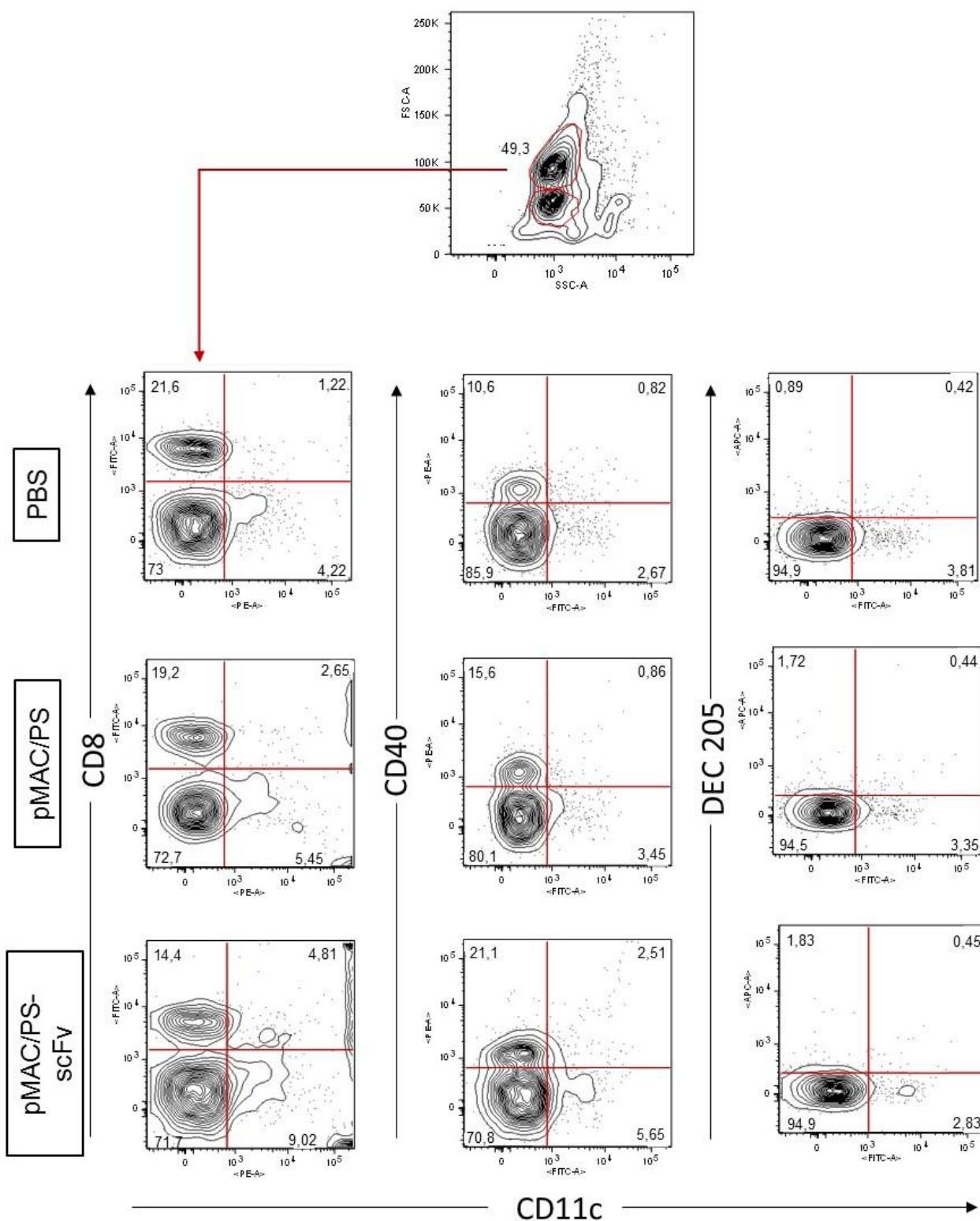


Figura 5. Imunização com pMAC/PS-scFv aumenta população de DCs CD11c⁺/CD8⁺ e CD11c⁺/CD40⁺ nos linfonodos. Camundongos (4 por grupo) foram imunizados pela via intramuscular com pMAC/PS-scFv e após 7 dias os linfonodos poplíteos e inguinais foram retirados e as células ajustadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ para a marcação com anti-CD11c, anti-CD8, anti-CD40 e anti-DEC-205. Como controle utilizamos pMAC/PS e PBS. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo *software* FlowJo. Foram obtidos 50.000 eventos.

4.2 Imunização intramuscular com pMAC/PS-scFv aumenta a população de células T (CD4⁺ e CD8⁺) e reduz a população de células T regulatórias, nos linfonodos.

A análise do perfil de células T ativadas nos linfonodos de camundongos BALB/c (7 por grupo) imunizados com pMAC/PS-scFv foi importante para verificar se a nossa construção gênica poderia modular a resposta imunológica nos linfonodos. Para isto, obtivemos as células totais destes órgãos após 7 dias de imunização com PBS, pMAC/PS ou pMAC/PS-scFv. As células totais de cada animal foram contadas para análise da relação de células por animal e posteriormente, as mesmas foram marcadas com anti-CD3/anti-CD4, anti-CD3/anti-CD8 e anti-CD3/anti-CD4⁺/FoxP3. Os resultados mostraram que a imunização com pMAC/PS-scFv levou a um aumento de células/animal nos linfonodos regionais, quando comparado com o controle (PBS) como visto na Figura 6 A. O mesmo aumento também pôde ser observado quando analisamos as populações de células T CD4⁺ (**Figura 6 B**) e T CD8⁺(**Figura 6 C**), porém, as células T reguladoras sofreram redução em sua população (**Figura 6 D**).

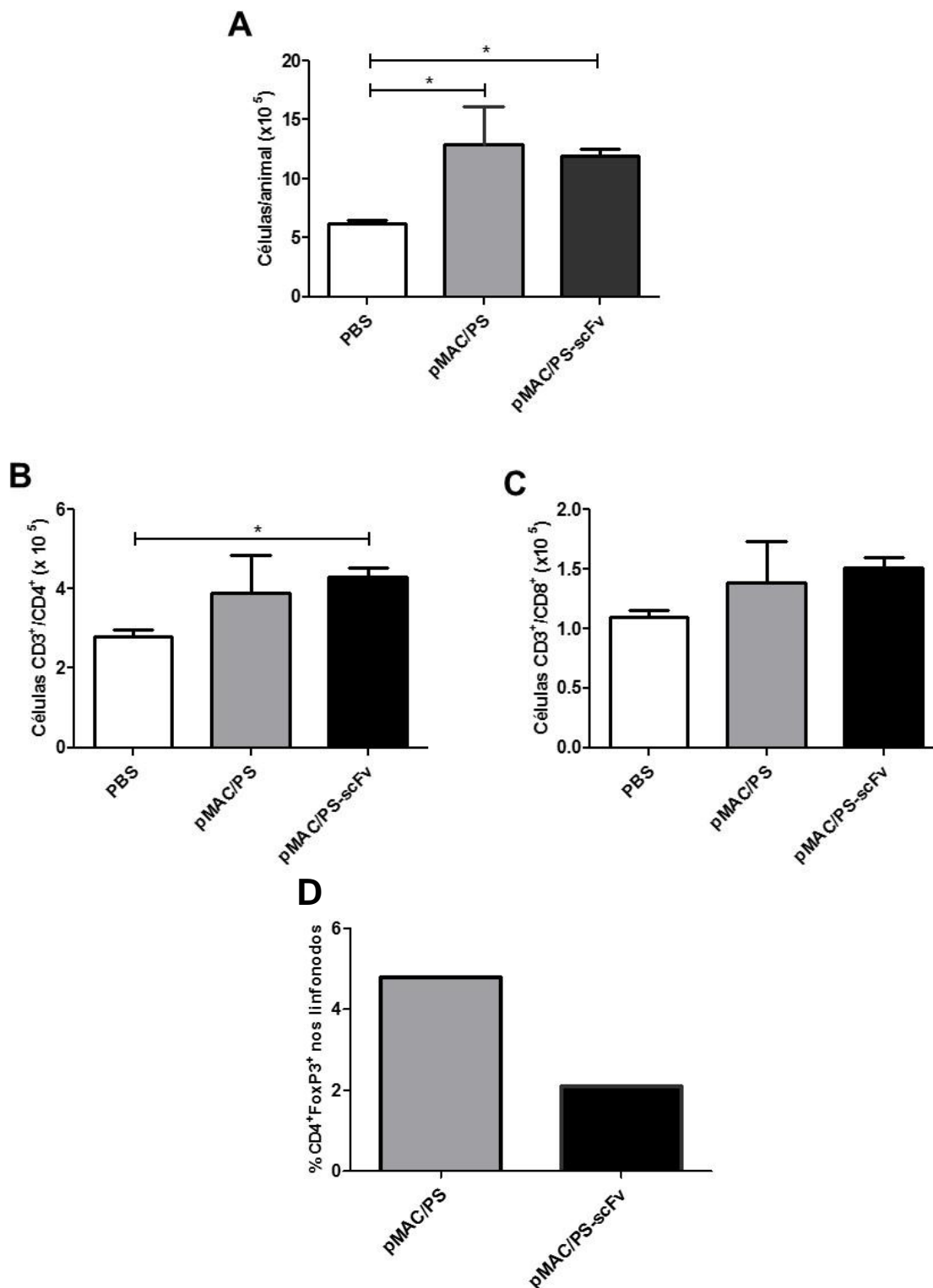


Figura 6. pMAC/PS-scFv induz aumento de células CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺ e diminuição de células CD3⁺/CD4⁺/FoxP3. Camundongos (7 por grupo) imunizados por via intramuscular com PBS e pMAC/PS (controles) e pMAC/PS-scFv foram sacrificados e após 7 dias os linfonodos, poplíteos e inguinais, foram obtidos. (A) Valor absoluto de células, dos linfonodos, por animal. As células foram contadas através de câmara de Neubauer. (B) Células obtidas dos linfonodos foram marcadas com CD3⁺/CD4⁺, (C) CD3⁺/CD8⁺ e (D) CD3⁺/CD4⁺/FoxP3. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo *software FlowJo*. Foram obtidos 50.000 eventos. * $p < 0.05$.

4.3 Transfecção de DCs não altera a expressão de moléculas de superfície.

Para analisarmos a eficiência da transfecção em DCs, estas foram co-transfectadas com vetor p-NEO que possui fluorescência, a análise foi feita por microscopia de fluorescência. O resultado mostra que cerca de 80 % das células incorporaram o plasmídeo (**Figura 7A**). Ainda, devido a metodologia utilizada para transfectar as DCs alterar a membrana celular, analisamos, após 24 horas de transfecção, a expressão de moléculas de superfície (MHC-II, CD86, CD40 e CD80) para determinarmos se os transfectomas modificavam a expressão destas. Os resultados mostraram que o processo de transfectar as DCs com o plasmídeo vazio, ou contendo o inserto scFv não altera a expressão das moléculas destas células, quando comparado com o controle (somente DCs) (**Figura 7B**).

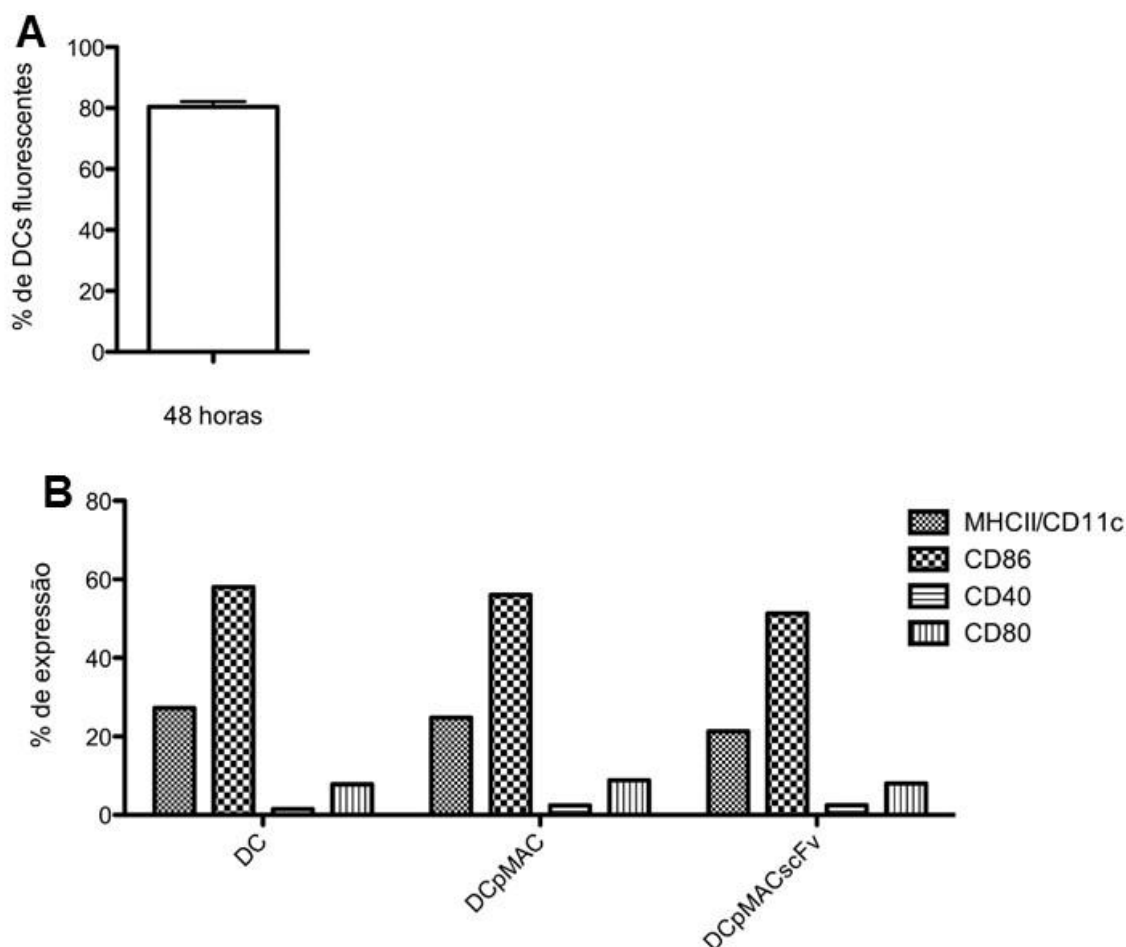


Figura 7. Eficiência da transfecção de DCs. (A) A análise da eficiência de transfecção foi analisada em microscopia de fluorescência, contando as células que emitiam fluorescência. (B) Para análise da transfecção, 1×10^6 DCs foram transfectadas com 20 $\mu\text{g/mL}$ de plasmídeo vazio (pMAC/PS) ou contendo o scFv (pMAC/PS-scFv) (20 $\mu\text{g/mL}$). Após 24 horas, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes anti-MHC-II/anti-CD11c, anti-CD86, anti-CD40 e anti-CD80. A obtenção dos resultados foi feita por citometria de fluxo (FACsCANTO) e a análise pelo software *FlowJo*. Foram obtidos 50.000 eventos. Como controle utilizamos DCs não transfectadas.

4.4 Terapia com DC-pMAC/PS-scFv induz aumento da população de células T e de DCs ativadas

Para avaliarmos se o tratamento com os transfectomas seria capaz de estimular populações de células T ($T\ CD4^+$ e $TCD8^+$) bem como recrutar DCs com potencial migratório ($CCR7^+$) e estimulatório de células T ($CD40^+$), camundongos BALB/c foram previamente infectados com a cepa de Pb18 e após 7 e 14 dias da infecção os animais foram imunizados com PBS, DC, DC-pMAC/PS ou DC-

pMAC/PS-scFv. Após sete dias da última imunização, os pulmões foram retirados e as células totais marcadas com: anti-CD3/anti-CD4, anti-CD3/anti-CD8 e anti-CCR7/anti-CD40. Os resultados mostram que animais infectados e tratados com DCs-pMAC/PS-scFv induziram aumento da população de células T CD4⁺ (**Figura 8 A**), T CD8⁺ (**Figuras 8 B**), bem como no recrutamento de DCs expressando CCR7 e CD40 (**Figura 9**) quando comparados com os animais controles (não infectados e tratados com DCs-pMAC/PS-scFv). As células CD11c⁺ representaram em média 46,8 % das células totais e a partir destas, foi analisado a porcentagem da expressão de CCR7 e CD40.

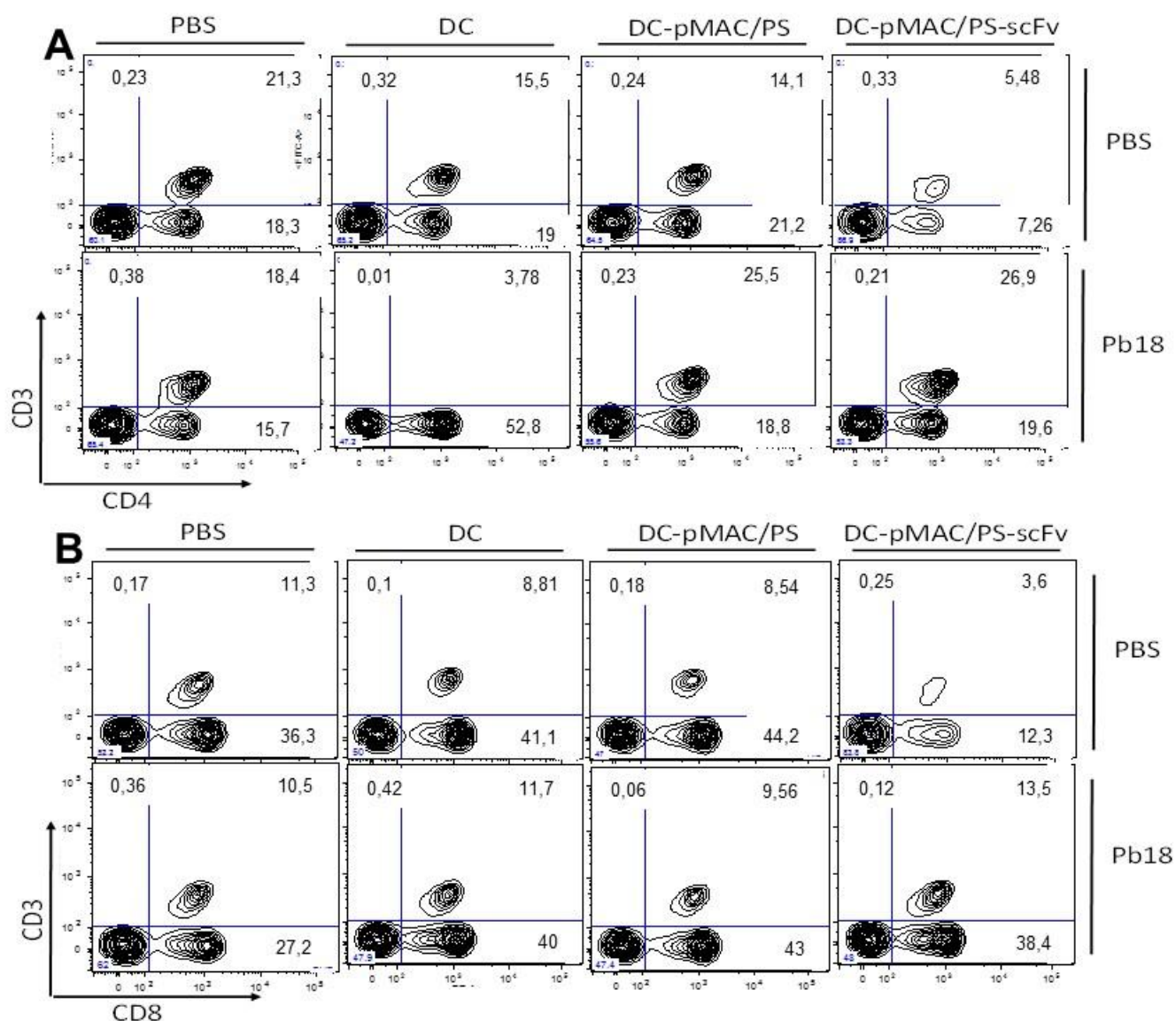


Figura 8. Ativação de linfócitos T. 1×10^6 DCs foram transfectadas com pMAC/PS (20 $\mu\text{g/mL}$) e pMAC/PS-scFv (20 $\mu\text{g/mL}$) para a realização do tratamento. Camundongos foram infectados (i.t.) com 1×10^6 de leveduras de Pb18. Após 7 e 14 dias da infecção os animais foram imunizados com PBS, DC, DC-pMAC/PS ou DC-pMAC/PS-scFv. Após a última imunização, os pulmões foram retirados e as células totais foram marcadas com (A) anti-CD3/anti-CD4 e (B) anti-CD3/anti-CD8. A aquisição dos resultados foi feita por citometria de fluxo (FACSCANTO) e a análise no software *FlowJo*. Foram obtidos 50.000 eventos. Como controle utilizamos camundongos tratados somente com PBS, DCs não transfectadas e transfectadas somente com o vetor (DC-pMAC/PS).

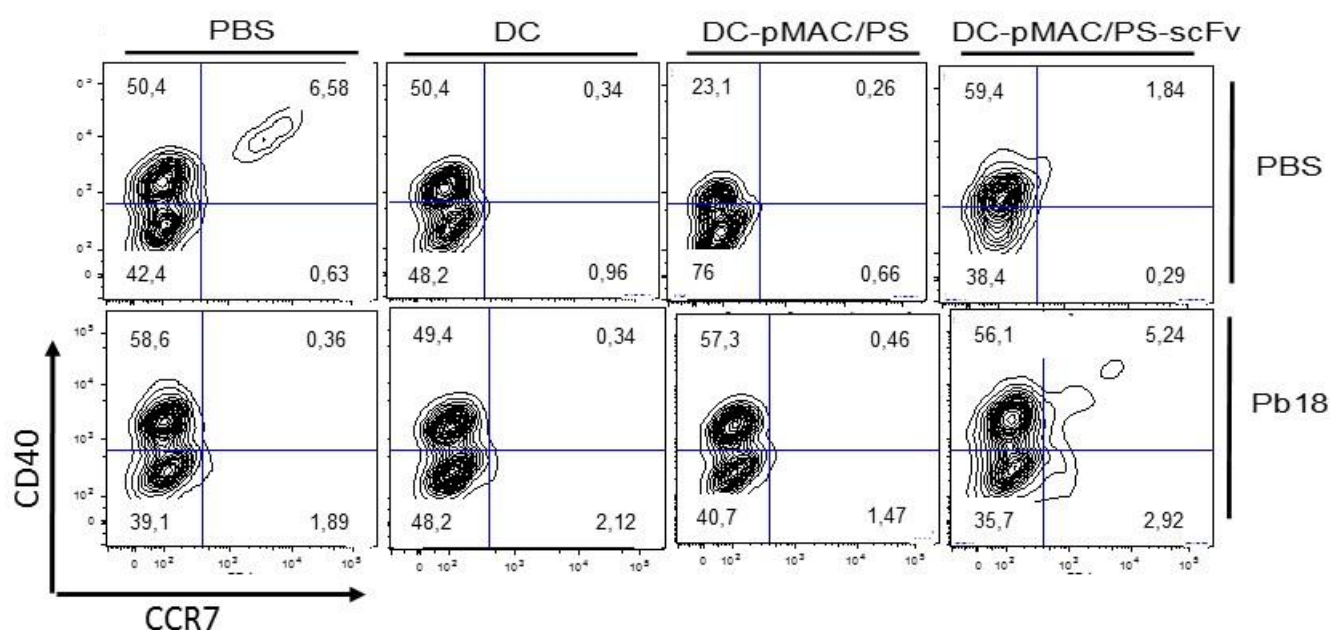


Figura 9. Ativação de DCs. 1×10^6 DCs foram transfectadas com pMAC/PS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e pMAC/PS-scFv (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para a realização do tratamento. Camundongos foram infectados (i.t.) com 1×10^6 de leveduras de Pb18. Após 7 e 14 dias da infecção os animais foram imunizados com PBS, DC, DC-pMAC/PS ou DC-pMAC/PS-scFv. Após a última imunização, os pulmões foram retirados e as células totais foram marcadas com anti-CCR7/anti-CD40. A obtenção dos resultados foi feita por citometria de fluxo (FACSCANTO) e a análise no *software* FlowJo. Foram obtidos 50.000 eventos. Como controle utilizamos camundongos tratados somente com PBS, DCs não transfectadas e transfectadas somente com o vetor (DC-pMAC/PS).

4.5 DCs-pMac/PS-scFv modula produção de citocinas

Sabendo da importância das citocinas na resposta imune na PCM, dosamos a produção de IL-4, IFN- γ e IL-12 em cultura de células totais de linfonodos axilares e paratímicos, bem como dos pulmões obtidos de camundongos previamente infectados e tratados no 7^o e 14^o dias, após a infecção, com: PBS, DC, DC-pMAC/PS ou DC-pMAC/PS-scFv. Após 7 dias do último tratamento, obtivemos as células totais destes órgãos e cultivamos *in vitro* por 24 horas. Posteriormente, recolhemos os sobrenadantes e dosamos as citocinas por ELISA. Como mostra a figura 10 (A, B e C), verificamos que houve aumento significativo dos níveis de IFN- γ , IL-12 e IL-4, no sobrenadante de cultura de células dos linfonodos do grupo imunizado com DC-pMAC/PS-scFv, quando comparamos com os controles. Já, quando dosamos as mesmas citocinas a partir de sobrenadante de cultura de

células pulmonares, os resultados mostraram diminuição significativa de todas as citocinas dosadas em relação ao grupo só infectado, como mostra a Figura 10 (A, B e C).

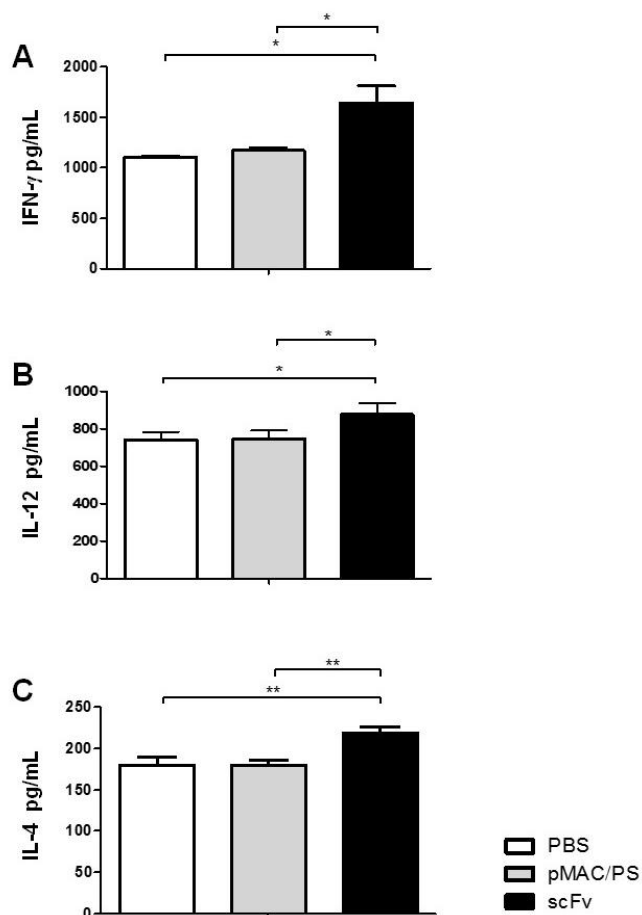


Figura 10. Terapia com DC-pMAC/PS-scFv induz aumento de citocinas nos linfonodos. Camundongos BALB/c (4 por grupo) foram infectados pela via intratraqueal com 1×10^6 leveduras do Pb18. Após 7 e 14 dias, os grupos foram tratados com PBS, DCs transfectadas com o vetor vazio (pMAC/PS) e DCs transfectadas com o scFv (DC-pMAC/PS-scFv). Após 7 dias da última imunização, os linfonodos foram retirados, as células totais obtidas e cultivadas. Após 24 horas o sobrenadante foi obtido para análise de citocinas, (A) IFN- γ (B) IL-12 e (C) IL-4, por ELISA. * $p < 0.05$ e ** $p < 0,001$.

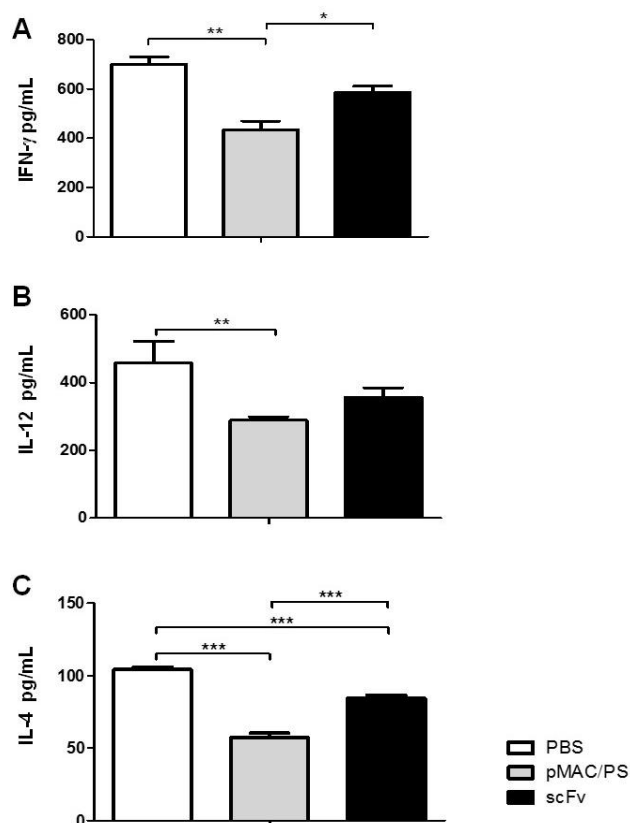


Figura 11. Terapia com DC-pMAC/PS-scFv modula produção de citocinas pulmonares. BALB/c foram infectados via intratraqueal com 1×10^6 leveduras do Pb18. Após 7 e 14 dias, os grupos foram tratados com PBS, DCs transfectadas com o vetor vazio (pMAC/PS) e DCs transfectadas com o scFv (DC-pMAC/PS-scFv). Após 7 dias da última imunização, os linfonodos foram retirados, as células totais obtidas e cultivadas. Após 24 horas o sobrenadante foi obtido para análise de citocinas, (A) IFN- γ (B) IL-12 e (C) IL-4, por ELISA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ e *** $p < 0.0001$.

4.6 Terapia com DCs-pMAC/PS-scFv induz produção de anticorpos

Para avaliarmos se a construção do scFv quando transfectado em DCs era capaz de induzir uma resposta humoral específica, analisamos os níveis de imunoglobulinas totais do tipo IgG produzidos, bem como os isotipos IgG1a e IgG2b. Para esta análise, camundongos BALB/c foram infectados pela via intratraqueal com a cepa Pb18 e, posteriormente, receberam duas doses (7^o e 14^o dia) de diferentes tratamentos: PBS, DCs, DC-pMAC/PS ou DC-pMAC/PS-scFv. Como controle, também utilizamos camundongos não infectados e não tratados. Um dia antes de cada imunização e 7 dias após a última, o soro destes animais foi obtido e a dosagem de IgG realizada em diferentes diluições (1:10 e 1:50) na presença de 2 μ g e 4 μ g de antígeno livre da parede do fungo (CFA) e na presença de 20 μ g de gp43.

Já os isotipos foram dosados com 4 μ g de CFA. Os resultados obtidos mostraram que ocorreu produção de IgG total na presença tanto de CFA (2 μ g e 4 μ g) (**Figuras 12 A e B**, respectivamente) como de gp43 (20 ug) (**Figura 12 C**), porém no decorrer do tratamento observamos redução desses níveis quando os animais foram tratados com os transfectomas de DCs (DC-pMAC/PS-scFv). Já, analisando o perfil dos isotipos produzidos, observamos aumento de IgG2b e diminuição de IgG1a após o segundo tratamento, como mostram as figuras 13 A e B, respectivamente.

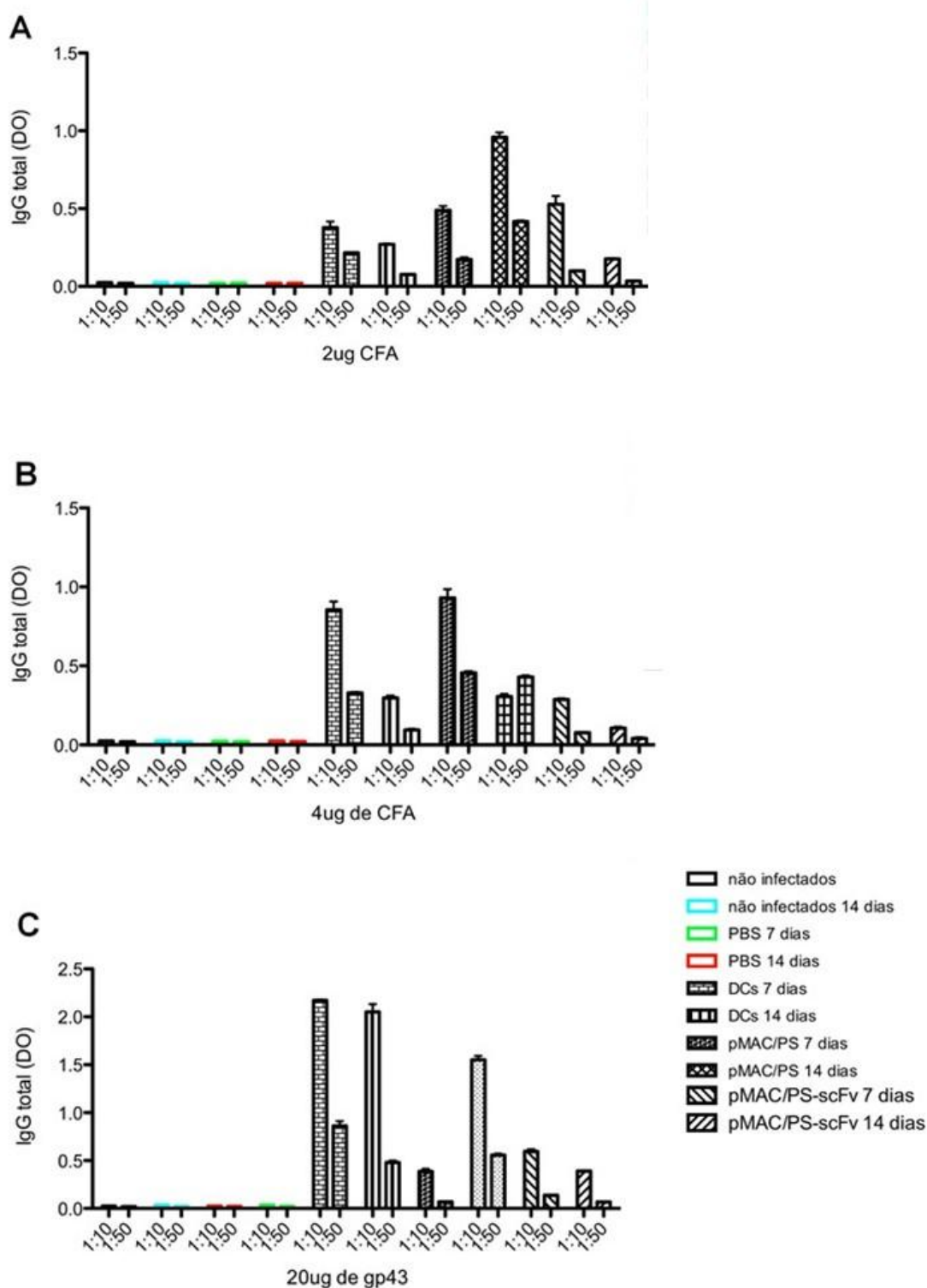


Figura 12. Produção de IgG total. Camundongos BALB/c (4 por grupo) foram infectados pela via intratraqueal com 1×10^6 leveduras do Pb18. Após 7 e 14 dias, os grupos foram tratados com PBS, DCs, DCs transfectadas com o vetor vazio (DC- pMAC/PS) e DCs transfectadas com o scFv (DC pMAC/PS-scFv). Ainda, como controle, utilizamos camundongos não infectados e não tratados. O soro desses animais foram obtidos um dia antes a cada imunização e após 7 dias da última para análises de IgG por ELISA, na presença de 2 μ g e 4 μ g de CFA (A e B) ou 20 μ g de gp43 (C).

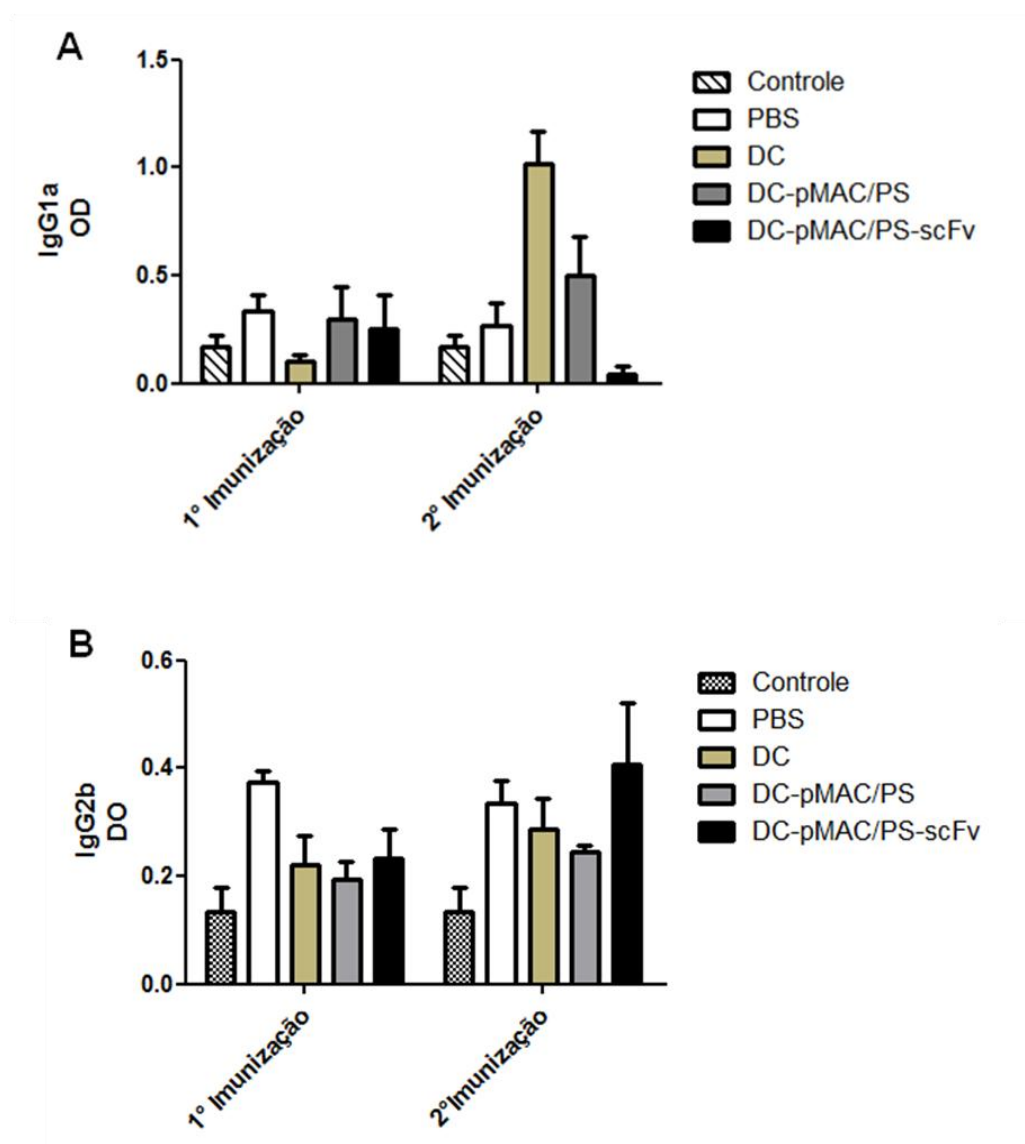


Figura 13. Isotipos de IgG. Camundongos BALB/c (4 por grupo) foram infectados pela via intratraqueal com 1×10^6 leveduras do Pb18. Após 7 e 14 dias, os grupos foram tratados com PBS, DCs, DCs transfectadas com o vetor vazio (DC- pMAC/PS) e DCs transfectadas com o scFv (DC pMAC/PS-scFv). Ainda, como controle, utilizamos camundongos não infectados e não tratados. O soro desses animais foram obtidos um dia antes a cada imunização e após 7 dias da última para análises de IgG1a (A) e IgG2b (B) por ELISA. Os ensaios foram realizados na presença de $4 \mu\text{g}$ de CFA.

5. DISCUSSÃO

Os tratamentos existentes para a PCM são muito longos e em muitos casos demoram mais que dois anos. Dessa forma, uma grande parte dos pacientes interrompem o tratamento antes mesmo da alta médica (MARQUES et al., 2006). Hoje diversos trabalhos objetivam formas mais eficazes para o combate a esta doença. Tabora e colaboradores, em 1998, identificaram um peptídeo, denominado P10, derivado da gp43 de *P. brasiliensis* e observaram que esse era capaz de proteger camundongos infectados por via i.t. com o fungo induzindo uma resposta tipo Th1. Posteriormente, Marques e colaboradores (2006), mostraram que a utilização do P10 em combinação com um regime quimioterápico se mostrou eficaz na redução do tempo de tratamento e na recidiva da doença.

Nosso grupo de pesquisa (FERREIRA et al., 2011) construiu uma molécula, scFv, a partir de anticorpos Ab2 β , que mimetiza o antígeno gp43 de *P. brasiliensis* e demonstrou que a utilização de DCs transfectadas com scFv foram capazes de apresentar tal proteína para as células dos linfonodos inguinais e poplíteos, de camundongos imunizados pela via intramuscular, bem como foram capazes de induzir linfoproliferação antígeno-específica de células T CD4⁺. Ainda, no mesmo trabalho, foi visto que camundongos infectados (i.t.) com *P. brasiliensis* e tratados com DC-pMAC/PS-scFv induziram diminuição da carga fúngica pulmonar, mostrando que tal construção gênica tem um grande potencial no tratamento da PCM.

Sabe-se que células Th1 têm um papel fundamental na mediação da resposta protetora contra *P. brasiliensis*, enquanto que padrões Th2 estão envolvidos diretamente com a severidade da doença. Para que haja a ativação destas respostas, é necessário a participação das DCs, que desempenham um papel fundamental no link entre a resposta inata e adaptativa (KARHAWI et al, 2000; BERNARD et al., 2001; SOUTO et al., 2000; CALVI et al., 2003). Dessa forma, para entendermos melhor os mecanismos pelos quais o modelo de tratamento com DC-pMAC/PS-scFv foi eficiente, avaliamos o perfil fenotípico das DCs transfectadas com pMAC/PS-scFv, bem como a resposta celular (Th1/Th2) induzida por elas.

Inicialmente, analisamos se a molécula scFv inserida no vetor de célula de mamífero (pMAC/PS-scFv) seria capaz de ativar as DCs residentes, estimulando sua capacidade migratória. Nossos resultados mostraram que após imunização

intramuscular com pMAC/PS-scFv, ocorreu migração das DCs para os linfonodos regionais, com aumento das moléculas CD11c⁺/CD40⁺ (**Figura 5**), importantes na ativação de uma resposta celular. Este resultado é importante, pois DCs que expressam estas moléculas são mais eficientes na ativação das células T, pois esta molécula se liga ao CD40 ligante destas células, ativando-as. Estudos mostram que camundongos deficientes de CD40 ligante apresentam redução da resposta de células T em seu estágio ativação. Ainda, sabemos que a ligação CD40-CD40L dá início a duas vias de sinalização: uma que sinaliza a ativação de células T e a outra que induz a expressão de B7 nas DCs estimulando assim a proliferação celular (WATTS, 2005). Nossos resultados também mostraram um aumento na população de células CD4⁺ e CD8⁺ quando comparado com o basal nos linfonodos, sugerindo a participação do scFv na proliferação linfocitária (**Figura 6 A, B e C**).

Analisando a expressão de CD8⁺ em DCs, também observamos aumento desta molécula (**Figura 5**) e de acordo com a literatura (PORTER et al., 2011), DCs que expressam esta molécula estão envolvidas no processo de tolerância imunológica. De acordo com Ganesh e colaboradores (2009), DCs CD8⁻ na presença de GM-CSF são consideradas tolerogênicas e estas células são capazes de induzir Treg Foxp3⁺ e aumentar a produção de IL-10. Já, DCs CD8⁺ na presença do mesmo estimulador não são capazes de induzir estas mesmas células. Estes dados fortalecem nossos resultados, pois além de observarmos aumento da expressão da molécula CD8⁺ nas DCs transfectadas com o scFv, observamos diminuição de células T reguladoras nos linfonodos de camundongos imunizados com o pMAC/PS-scFv (**Figura 6 D**).

As células Treg são fundamentais no controle de doenças autoimunes, transplantes de processos infecciosos (McHUGH; SHEVACH, 2002; BELKAID; ROUSE, 2005; RUDENSKY, 2011). No entanto, na PCM este processo imunoregulatório ainda não está bem esclarecido. Em 2012, Felonato e colaboradores mostraram que camundongos suscetíveis e resistentes à esta micose, quando tratados com anti-CD25 apresentavam diminuição da carga fúngica nos pulmões, fígado e baço, mostrando a importância destas células na disseminação da infecção.

Visto que a imunização com o nosso pMAC/PS-scFv gera uma resposta linfocitária com recrutamento de DCs, nosso próximo estudo foi avaliar se esta molécula, quando transfectada com DCs derivadas da medula óssea, seriam

capazes de modular eficientemente a resposta imune em nosso modelo experimental. Após realizarmos o procedimento de transfecção nas DCs (DC-pMAC/PS-scFv), analisamos se o processo de inserção do DNA nestas células levaria alguma alteração na expressão de suas moléculas de superfície. Através da metodologia empregada, não visualizamos diferença na expressão das moléculas MHC-II, CD11c, CD80 e CD86 (**Figura 7**), mostrando que o processo de transfecção não altera os principais marcadores de superfície destas células.

Ainda, para entendermos como as DCs transfectadas com o scFv estariam modulando a resposta imune na PCM, analisamos o perfil de células ativadas, citocinas produzidas e a indução da resposta imune humoral em camundongos infectados com a levedura virulenta do fungo (Pb18) e que após 7 e 14 dias foram tratados com DC-pMAC/PS-scFv.

Como toda resposta gera produção de diversos mediadores e ativa diferentes populações celulares, após a última imunização com tal transfectoma observamos um maior recrutamento de DCs CCR7⁺/CD40⁺ (**Figura 9**), mostrando mais uma vez, porém agora em modelo de tratamento, que o nosso inserto aumenta DCs altamente capazes de ativar e induzir proliferação de células T (DCs CD40⁺) (WATTS, 2005), bem como DCs migratórias (CCR7⁺), que migram dos tecidos periféricos para os órgãos linfoides iniciando uma resposta celular (FOSTER et al, 1999; GUNN et al, 1999). Neste mesmo estudo, também foi visto aumento da população de células T CD4⁺ e T CD8⁺ nos pulmões, quando comparamos com os animais controle (**Figura 8 A e B**), sugerindo a participação da resposta imune celular e humoral no controle da infecção. Ainda, analisando as citocinas induzidas por este processo, observamos diminuição de IL-4, IL-12 e IFN- γ , também quando comparado ao controle (**Figura 11**). Ao analisarmos as mesmas citocinas, agora produzidas por células totais de linfonodos regionais (axilares e paratímicos), observamos aumento em todas (**Figura 10**). Estes resultados sugerem que nosso modelo de tratamento induz um padrão misto de resposta (Th1/Th2). Já foi demonstrado em camundongos resistentes a PCM, que as células T CD4⁺ e T CD8⁺ estão envolvidas no processo de imunidade e que, as mesmas, secretam um padrão misto de resposta, porém com predominância de IFN- γ (KASHINO et al., 2000; CANO et al., 1998 e CHIARELLA et al., 2007).

A fim de sabermos se o nosso transfectoma (DC-pMAC/PS-scFv) seria capaz de ativar a resposta imune humoral, com o mesmo modelo de tratamento, dosamos

a produção de IgG total, bem como dos isotipos IgG1 e IgG2b. Os resultados mostraram que ocorreu a produção de IgG, principalmente nos animais tratados com DC e DC-pMAC/PS (controles). Já, quando os camundongos foram tratados com DC-pMAC/PS-scFv, observamos diminuição da produção de IgG específica em relação ao grupo tratado com o transfectoma DC-pMAC/PS (**Figura 12**), sugerindo a eficiência do nosso inserto neste modelo de terapia para a PCM. Ainda, para definirmos o perfil de IgG produzida, dosamos os isotipos IgG1a e IgG2b. De acordo com a literatura (STAVNEZER et al., 1996), IgG1 modula a resposta para o tipo Th2, enquanto que IgG2b está relacionada a uma resposta do tipo Th1. Nossos resultados mostraram que esses animais apresentaram uma diminuição de IgG1 e aumento de IgG2b, principalmente após a segunda imunização com DC-pMAC/PS-scFv (**Figura 13**), mostrando que a imunização com nosso transfectoma tende a um padrão Th1.

Recentemente, Ladjeimi e colaboradores (2011), mostraram que camundongos transgênicos MMTV.F.huHER2, que desenvolvem espontaneamente tumores mamários, imunizados com scFv69 (Ab3) induziram aumento progressivo dos níveis de IgG1, IgG2a e IgG2b até o 41º dia do tratamento, porém quando fizeram a razão entre IgG1/IgG2a observaram que houve uma redução gradativa destas durante o mesmo período.

A resposta imune gerada frente a um patógeno é muito complexa, no entanto, nossos resultados sugerem que os transfectomas de DCs são eficientes no modelo de tratamento realizado, pois modulam a resposta para o tipo Th1, sendo esta, a resposta protetora na PCM experimental.

6. CONCLUSÕES

- A imunização com scFv altera o perfil de DCs e linfócitos nos linfonodos:
 - ✓ Houve recrutamento de DCs com aumento na expressão das moléculas de superfície CD8 e CD40, bem como aumento de linfócitos T CD4 e T CD8 nos linfonodos poplíteos e inguinais. Já em relação as células T reguladores observamos redução em sua população.
 - A transfecção de DCs não altera o perfil da célula:
 - ✓ Após 24 horas do processo de transfecção, não houve alteração nos níveis de expressão das moléculas de superfície MHC-II, CD11c, CD80, CD86 e CD40.
 - O tratamento com DC-pMAC/PS-scFv, após infecção com *P. brasiliensis*, altera o perfil celular pulmonar:
 - ✓ Após 7, 14 e 21 dias de infecção foi realizado os tratamentos, houve aumento na população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e de DCs que expressão CCR7 e CD40.
 - As citocinas IFN- γ , IL-12 e IL-4 sofreram aumento em seus níveis, nos pulmões, e redução, nos linfonodos, após tratamento com DC-pMAC/PS-scFv.
 - Perfil da resposta humoral:
 - ✓ Após o tratamento com DC-pMAC/PS-scFv houve diminuição dos níveis de IgG total e uma tendência a resposta Th1 devido à redução de IgG1a e aumento de IgG2b.

Esses dados em conjunto, nos indicam que o tratamento com DC-pMAC/PS-scFv é eficiente na infecção por *P. brasiliensis*, devido a modulação de uma resposta Th1.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; KUROKI, M.; TACHIBANA, K.; LI, T.; AWASTHI, A.; UENO, A.; MATSUMOTO, H.; IMAKURE, T.; YAMOUCI, Y.; YAMADA, H.; ARIYOSHI, A.; KUROKI, M. Target sonodynamic therapy of cancer using a photosensitizer conjugated with antibody against carcinoembryonic antigen. **Anticancer Research**, v.22, p.1575-1580, 2002.
- AGUIAR, W.S.; SILVA, B.M.; PASSOS, E.D.; ZANDONADE, E.; FALQUETO, A. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a casecontrol study in the State of Espírito Santo, Brazil. **Cad. Saude Publica**, v.19, p.245–253, 2003. (In Portuguese.)
- ALLAN, R.S.; WAITHMAN, J.; BEDOUI, S.; JONES, C.M.; VILLADANGOS, J.A.; ZHAN, Y.; LEW, A.M.; SHORTMAN, K.; HEATH, W.R.; CARBONE, F.R. Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. **Immunity**, v.25, p.153–162, 2006.
- ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v.5, p.125-141, 1930.
- ALMEIDA, O.P; JACKS, J. Jr; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.14, p.377-383, 2003.
- ALMEIDA, S. M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TEIVE, H.A.; RIBEIRO, C.E.; WERNECK, L.C. Central nervous system paracoccidioidomycosis: clinical features and laboratorial findings. **J. Infect.** v.48, p.193–198, 2004.
- BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y.-J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells, **Annual Review of Immunology**, v.18, p.767–811, 2000.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v.392, n.6673, p.245-252, 1998.
- BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. **Annual Review of Immunology**, v.27, p.551–589, 2009.
- BELL, D.; YOUNG, J.W.; BANCHEREAU, J. Dendritic cells. **Advances in Immunology**, v.72, p.255-324, 1999.
- BENARD, G.; ROMANO, C.C.; CACERE, C.R.; JUVENALE, M.; MENDES GIANNINI, M.J.; DUARTE, A.J. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v.13, n.4, p.248-252, 2001.
- BETÁKOVA, T.; VARECKOVÁ, E.; KOSTOLANSKÝ, F.; MUCHA, V.; DANIELS, R.S. Monoclonal anti-idiotypic antibodies mimicking the immunodominant epitope of influenza virus haemagglutinin elicit biologically significant immune responses. **Journal of General Virology**, v.79, p.461-470, 1998.
- BLOTTA, M.H.; MAMONI, R.L.; OLIVEIRA, S.J.; NOUER, S.A.; PAPAORDANOU, P.M.; GOUVEIA, A.; CAMARGO, Z.P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, n.3, p.390-394, 1999.
- BONA, C.; MORAN, T. Idiotypic vaccines. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* 136:299-312, 1985.

BONA, C.A. Internal image concept revisited. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.213, p.32-42, 1996.

BONIFAZ, A. **Micología média básica**. McGraw Hill Interamericana Editores, 2010.

BRÍGIDO, M.M.; POLYMENIS, M.; STOLLAR, B.D. The role of mouse Vh10 and VI gene segments in the specific binding of antibody to Z-DNA, analyzed with recombinant single chain Fv molecules. **Journal of Immunology**, v.150, p.469-475, 1993.

BRUMMER, L.; CASTANEDA, F.; RESTREPO, A.A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, p.89-117, 1993.

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

CALVI, S.A.; PERACOLI, M.T.; MENDES, R.P.; MARCONDES-MACHADO, J.; FECCHIO, D.; MARQUES, S.A.; SOARES, A.M. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes and Infection**, v.5, n.2, p.107-113, 2003.

CAMARGO, Z.P. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.165, p.289-302, 2008.

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

CANO, L.E.; KASHINO, S.S.; ARRUDA, C.; ANDRE, D.; CALICH, V.L.G. Protective role of interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v.66, p.800-806, 1998.

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

CLEMONS, K.V.; FELDMAN, D.; STEVENS, D.A. Influence of estradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of General Microbiology**, v.135, p.1607-1617, 1989.

D'OSTIANI, C.F.; DEL SERO, G.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; SPRECA, A.; MENCACCI, A.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; ROMANI, L. Dendritic cells discriminate between yeast and hyphae of the fungus *Candida albicans*: implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Experimental Medicine**, v.191, n.10, p.1661-1674, 2000.

DEN HAAN, J.M.; LEHAR, S.M.; BEVAN, M.J. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells *in vivo*. **Journal of Experimental Medicine**, v.192, p.1685-1696, 2000.

DUDZIAK, D.; KAMPHORST, A.O.; HEIDKAMP, G.F.; BUCHHOLZ, V.R.; TRUMPFHELLER, C.; YAMAZAKI, S.; CHEONG, C.; LIU, K.; LEE, H.-W.; PARK, C.G.; STEINMAN, R.M.; NUSSENZWEIG, M.C. Differential antigen processing by dendritic cell subsets *in vivo*. **Science**, v.315, n.5808, p.107-111, 2007.

ENGEL, D.; DOBRINDT, U.; TITTEL, A.; PETERS, P.; MAURER, J.; GUTGEMANN, I.; KAISLING, B.; KUZIEL, W.; JUNG, S.; KURTS, C. Tumor necrosis factor alpha- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells are rapidly recruited to the bladder in urinary tract infection but are dispensable for bacterial clearance. **Infect Immun**, v.74, p.6100–6107, 2006.

FAVA, S.D.C.; FAVA-NETTO, C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.40, p.1–14, 1998.

FELONATO, M.; PINA, A.; ARAUJO, E.F.; LOURES, F.V.; BAZAN, S.B.; FERIOTTI, C.; CALICH, V.L.G. Anti-CD25 treatment depletes treg cells and decreases disease severity in susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Plos One**, v.7, n.11, p.E51071-1-E51071-20, 2012.

FERREIRA, K.S.; ALMEIDA, S.R. Immunization of susceptible mice gp43-pulsed dendritic cells induced an increase of pulmonary paracoccidioidomycosis. **Immunology Letters**, v.2, p.121-126, 2005.

FERREIRA, K.S.; MARANHÃO, A.Q.; GARCIA, M.C.C.; BRÍGIDO, M.M.; SANTOS, S.S.; LOPES, J.D.; ALMEIDA, S.R. Dendritic cells transfected with scFv from Mab 7.B12 mimicking original antigen gp43 induces protection against experimental paracoccidioidomycosis. **PLos One**, v.6, p.1-5, 2011.

FERREIRA, M.C.; OLIVEIRA, R.T.D.; SILVA, R.M.; BLOTTA, M.H.S.L.; MAMONI, R.L. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. **Infection of Immunity**, v.78, n.10, p.4392-4401, 2010.

FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med.**, v.170, p.2081-2095, 1989.

FÖRSTER, R.; DAVALOS-MISSLITZ, A.C.; ROT, A. CCR7 and its ligands: Balancing immunity and tolerance. **Nat Rev Immunol.**, v.8, p.362-371, 2008.

FÖRSTER, R.; SCHUBEL, A.; BREITFELD, D.; KREMMER, E.; RENNER-MÜLLER, I.; WOLF, E.; LIPP, M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. **Cell**, v.99, n.1, p.23-33, 1999.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.25, p.5-18, 1986.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C.S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med. Mycol.** V.38, p.185–191, 2000.

FRANCO, M.; MENDES, R. P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; R. MONTENEGRO, M. Paracoccidioidomycosis. **Baillieres Clin. Trop. Med. Commun**, v.4, p.185–220, 1989.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.20, p.129-132, 1987.

FRANCO, M.F.; FAVA NETTO, C; CHAMMA, L.G. Indirect immunofluorescent reaction for the serodiagnosis of South American blastomycosis. Standardization of the reaction and comparison of results with the complement fixation test. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.15, p.393-398, 1973.

GANESH, B.B.; CHEATEM, D.M.; SHENG, J.R.; VASU, C.; PRABHAKAR, B.S. GM-CSF-induced CD11c+CD8a--dendritic cells facilitate Foxp3+ and IL-10+ regulatory T cell expansion resulting in suppression of autoimmune thyroiditis. **International Immunology**, v.21, p.269-282, 2009.

GESZTESI, J.L.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.; VICENTINI, A.P.; MORAES, J.Z.; FRANCO, M.F.; LOPES, J.D. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. **Hybridoma**, v.15, p.415-422, 1996.

GIRALDO, R.; RESTREPO, A.; GUTIERREZ, F.; ROBLEDO, M.; LONDONO, F.; HERNANDEZ, H.; SIERRA, F.; CALLE, G. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. **Mycopathologia**, v.58, p.63-70, 1976.

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

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v.20, p.612-667, 2002.

GUNN, M.D.; KYUWA, S.; TAM, C.; KAKIUCHI, T.; MATSUZAWA, A.; WILLIAMS, L.T.; NAKANO, H. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. **Journal of Experimental Medicine**, v.189, n.3, p.451-460, 1999.

HE, C.T.; LI, R.F.; KANG, Y.S.; ZHANG, Y. Expression and identification of recombinant soluble single-chain variable fragment of monoclonal antibody MC3. **World Journal of Gastroenterology**, v.8, p.258-262, 2002.

HERLYN, D.; SOMASUNDARAM, R.; LI, W.; MARUYAMA, H. Anti-idiotypic cancer vaccines: past and future. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v.43, p.65-76, 1996.

HOCHWELLER, K.; STRIEGLER, J.; HAMMERLING, G.J.; GARBI, N. A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells. **European Journal of Immunology**, v.38, p.2776-2783, 2008.

HORRÉ, R.; SCHUMACHER, G.; ALPERS, K.; SEITZ, H.M.; ADLER, S.; LEMMER, K.; DE HOOG, G.S.; SCHAAL, K.P.; TINTELNOT, K. A case of imported paracoccidioidomycosis in a German legionnaire. **Medical Mycology**, v.40, p.213-216, 2002.

HUSTON, J.S.; MUDGEH-HUNTER, M.; TAI, M.S.; McCARTNEY, J.; WARREN, F.; HARBER, E.; OPPERMAN, H. Protein engineering of single chain Fv analogs and fusion proteins. **Methods in Enzymology**, v.203, p.46-88, 1991.

IDOYAGA, J.; SUDA, N.; SUDA, K.; PARK, C.G.; STEINMAN, R.M. Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8 alpha+ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, p.1524-1529, 2009.

INABA, K.; INABA, M.; ROMANI, N.; AYA, H.; DEGUCHI, M.; IKEHARA, S.; MURAMATSU, S.; STEINMAN, R.M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone

marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Experimental Medicine**, v.176, p.1693-1697, 1992.

JERNE, N.K. Towards a network theory of the immune response. **Annales d'Immunologie**, v.125C, p.373-389, 1974.

JOHNSON, T.S.; MAHNKE, K.; STORN, V.; SCHONFELD, K.; RING, S.; NETTELBECK, D.M.; HAISMA, H.J.; LE GALL, F.; KONTERMANN, R.E.; ENK, A.H. Inhibition of melanoma growth by targeting of antigen to dendritic cells via an anti-DEC-205 single-chain fragment variable molecule. **Clinical Cancer Research**, v.14, p.8169-8177, 2008.

KARHAWI, A.S.; COLOMBO, A.L.; SALOMAO, R. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Medical Mycology**, v.38, n.3, p.225-229, 2000.

KASHINO, S.S.; CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.; ABRAHAMSOHM, P.A.; BURGER, E. Growth curves, morphology and ultrastructure of tem *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia**, v.99, p.119-128, 1987.

KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; CAFALLI-FAIATI, C.; MELONI-BRUNERI, L.H.; CALICH, V.L.G. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v.20, p.89-97, 2000.

KENETSUDA, F.; CARBONELL, L.M.; AZUMA, I.; YAMAMURA, Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v.110, n.1, p.208-218, 1972.

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

KUNKEL, H.G.; MANNIK, M.; WILLIAMS, R.C. Individual antigenic specificity of isolated antibodies. **Science**, v.140, n.3572, p.1218-1219, 1963.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI MELO, N. T. Paracoccidioidomycose, p. 639–729, 2002. In LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI MELO, N.T. (ed.), **Tratado de micologia medica Lacaz, Sarvier** vol. 9. LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G., eds. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: **CRC Press**, 1994. p.1-11.

LACAZ, C.S.; PASSOS FILHO, M.C.R.; FAVA NETTO, C.; MACARRON, R. Contribuição para o estudo da blastomicose-infecção: inquérito com paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico radiológico dos paracoccidioidino-positivos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.1, p.245-259, 1959.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8. Ed. São Paulo: **Sarvier**, 695p., 1991.

LADJEMI, M.Z.; CHARDES, T.; CORGNAC, S.; GARAMBOIS, V.; MORISSEAU, S.; ROBERT, B.; BASCOUL-MOLLEVI, C.; ARSA, A.I.; JACOT, W.; POUGET, J.; PELEGRIN, A.; NAVARRO-TEULON, I. Vaccination with human anti-trastuzumab anti-idiotypic scFv reverses HER2 immunological tolerance and induces tumor immunity in MMTV.f.huHER2(Fo5) mice. **Breast Cancer Research**, v.13, p.1-11, 2011.

LE GROS, G.; BEN-SASSON, S.Z.; SEDER, R.; FINKELMAN, F.D.; PAUL, W.E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4- producing cells. **J Exp Med.**, v.172, p.921-929, 1990.

LIU, K.; NUSSENZWEIG, M.C. Origin and development of dendritic cells. **Immunological Reviews**, v.234, p.45–54, 2010.

LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D. Paracoccidioidomicose: estudo clinico-micologico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. **J. Pneumol.**,v.16, p.129–132, 1990.

LOOSE, D.S.; STOVER, E.P.; RESTREPO, A.; STEVANS, D.A.; FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor like cytosol protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.80, p.7659-7663, 1983.

LOPES, J.D.; MOURA-CAMPOS, M.C.R.; VICENTINI, A.P.; GESZTESI, L.L.; SOUZA, W.; CAMARGO, Z.P. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, p.2309-2313, 1994.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. **Brasil-Médico**, v.22, p.121-124, 1908.

MACATONIA, S.E.; HOSKEN, N.A.; LITTON, M.; VIEIRA, P.; HSIEH, C.S.; CULPPER, J.A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; MURPHY, K.M.; O'GARRA, A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺T cells. **Journal of Immunology**, v.154, n.10, p.5071-5079, 1995.

MAMONI, R.L.; NOUÉR, S.A.; OLIVEIRA, S.J.; MUSATTI, C.C; ROSSI, C.L; CAMARGO, Z.P; BLOTTA, M.H. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioicomycosis. **Medical Mycology**, v.40, p.153-159, 2002.

MARQUES, A.F.; SILVA, M.B.; JULIANO, M.A.P.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.8, p.2814-2819, 2006.

McEWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PATINO, M.M.; SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.25, n.3, p.165-175, 1987.

McEWEN, J.G.; GARCIA, A.M.; ORTIZ, B.L.; BOTERO, S.; RASTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.**, v. 26, p.305-306, 1995.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY Jr., C. Innate Immunity. **New England Journal of Medicine**, v.343, p.33-44, 2000.

MILOUD, T; HÄMMERLING, G.J.; GARBI, N. Review of Murine Dendritic Cells: Types, Location, and Development. **Methods in Molecular Biology**, v.595, p.21-42, 2010

MOLL, H.; BERBERICH, C. Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniasis. **Immunobiology**, v.204, n.5, p.659-666, 2001.

- MONTENEGRO, M.R. Clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Trp Sao Paulo**, v.28, p.203-204, 1986.
- MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunology**, v.19, p.683-765, 2001.
- NISHIKAWA, H.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in tumor immunity. **International Journal of Cancer**, v.127C, p.759-767, 2010.
- NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Paracoccidioidomycosis. **Curr. Fungal Infect. Rep.** v.3, p.15-20, 2009.
- OLIVEIRA, S.J; MAMONI, R.; MUSATTI, C.C; PAPAORDANOU, P.M; BÇOTTA, M.H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect**, v.4, p.139-144, 2002.
- PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. **Current Opinion in Immunology**, v.14, p.420-431, 2002.
- PAN, Y.; YUHASZ, S.C.; AMZEL, L.M. Anti-idiotypic antibodies: biological function and structural studies. **FASEB Journal**, v.9, p.43-49, 1995.
- PEREIRA, R. M.; BUCARETCHI, F.; DE MELO BARISON, E.; HESSEL, G.; TRESOLDI, A.T. Paracoccidioidomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.46, p.127-131, 2004.
- PIGNATARI, G.C.; TAKESHITA, D.; PARISE, C.B.; SOARES, F.A.; DE MORAES, Z.Z.; HAN, S.W. Carcinoembryonic antigen (CEA) mimicry by an anti-idiotypic scFv isolated from anti-Id 6.C4 hybridoma. **Journal of Biotechnology**, v.127, p.615-625, 2007.
- PINZAN, C.F.; RUAS, L.P.;CASABONA-FORTUNATO, A.S.; CARVALHO,F.C.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Immunological basis for gender differences in murine Paracoccidioides brasiliensis infection. **PLoS One**, v.5, e10757, 2010.
- POPI, A.F; LOPES, J.D; MARIANO, M. GP43 from Paracoccidioides brasiliensis inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cellular Immunology**, v.218, p.87-94, 2002.
- PORTER, G.W.; YI, W.; DENZIN, L.K. TLR agonists downregulate H2-O in CD8alpha-dendritic cells. **Journal of Immunology**, v.187, p.4151-4160, 2011.
- PROBST, H. C.; LAGNEL, J.; KOLLIAS, G.; VAN DEN BROEK, M. Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potente inducers of CD8+ T cell tolerance. **Immunity**, v.18, p.713-720, 2003.
- PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P.A.J.; TRAVASSOS, L.A. Exocellular components of Paracoccidioides brasiliensis. Identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v.53, p.199-206, 1986.
- PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.1610-1615, 1991a.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R. The 43-kDa glycoprotein from human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.289, p.298-302, 1991b.

RAMOS-E-SILVA, M; SARAIVALdo, E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin.**, v.26, p.257-269, 2008.

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

RESTREPO, A.; MONCADA, L.H. Characterization of the precipitin bands detected in immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. **Applied Microbiology**, v.28, p.138-144, 1974.

RESTREPO, A.; MONCADA, L.H. Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel tests for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Applied Microbiology**, v.28, p.132-137, 1972.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E.; STOVER, E.P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D.A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v.26, p.346-345, 1984.

RESTREPO, A.; TOBO'N, A.; AGUDELO, C. Paracoccidioidomycosis, p. 331–342, 2008. In HOSPENTHAL, D.; RINALDI, M. (ed.), **Diagnosis and treatment of human mycoses. Humana Press.**

RESTREPO-MORENO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M. F.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. (Eds.). Paracoccidioidomycosis. Boca Ratón: **CRS Press**, p.121-128, 1994.

RICHINI-PEREIRA, V.B.; BOSCO, S.M.G.; THEODORO, R.C.; MACORIS, S.A.G.; BAGAGLI, E. Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, p.636-640, 2009.

ROEDERER, M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. **Cytometry**, v.45, p.194-205, 2001.

ROY, R.N.; KLEIN, B.S. Dendritic Cells in Antifungal Immunity and Vaccine Design. **Cell Host & Microbe**, v.11, p.436-446, 2012.

SALAZAR, M.E.; RETRESPO, A.; SETEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium to yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, v.56, p.711-713, 1988.

SCHWEGLER, C.; DORN-BEINEKE, A.; NITTKA, S.; STOCKING, C.; NEUMAIER, M. Monoclonal anti-idiotypic antibody 6G6.C4 fused to GM-CSF is capable of breaking tolerance to carcinoembryonic antigen (CEA) in CEA-transgenic mice. **Cancer Research**, v.65, p.1925-1933, 2005.

SERBINA, N.V.; SALAZAR-MATHER, T.P.; BIRON, C.A.; KUZIEL, W.A.; PAMER, E.G. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity**, v.19, p.59–70, 2003.

SHER, A.; COFFMAN, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Annual Review of Immunology**, v.10, p.385-398, 1992.

SHEVACH, E.M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity**, v.30, p.636-645, 2009.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F.Q.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.R.; MORETTI, M.A. Consenso de paracoccidioidomicose. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v.39, p.297-310, 2006.

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

SOUTO, J.T.; FIGUEIREDO, F., FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **American Journal of Pathology**, v.156, n.5, p.1811-1820, 2000.

SOUZA, A.R.; GESZTESI, J.L.; DEL NEGRO, G.M.; BERNARD, G.; SATO, J.; SANTOS, M.V.B.; ABRAHÃO, T.B.; LOPES, J.D. Anti-idiotypic antibodies in patients with different clinical forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.7, p.175-181, 2000.

SOUZA, A.R.; GESZTESI, J.L.; MORAES, J.Z.; CRUZ, C.R.B.; SATO, M.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Evidence of idiotypic modulation in the immune response to gp43, the major antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in both mice and humans. **Clinical and Experimental Immunology**, v.114, p.40-48, 1998.

SOUZA, E.B.; LOPES, J.D.; ALMEIDA, S.R. B and T cell responses elicited by monoclonal anti-idiotypic antibody (Ab2 β) mimicking gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clinical and Experimental Immunology**, v.137, p.123-128, 2004.

SPLENDRE, A. A Zymonematozi com localizzazione nella cavità della bocca, osservata in Brasile. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de Sés Filiales**, v.5, p.313-319, 1912.

STAVNEZER, J. Antibody class switching. **Advances in Immunology**, v.61, p.79-146, 1996.

STEINMAN, R.M. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. **Pathologie Biologie**, v.51, n.2, p.59-60, 2003.

STEINMAN, R.M.; WITMER, M.D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.75, p.5132-5136, 1978.

STEINMAN, R.M.; COHN, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **The Journal of Experimental Medicine**, v.137, p.1142-1162, 1973.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M.A.; SCHREIBER, R.D.; REMINGTON, J.S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v.240, p.516-518, 1988.

SWAIN, S.L.; WEINBERG, A.D.; ENGLISH, M.; HUSTON, G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. **J. Immunology**, v.145, p.3796-3806, 1990.

TABORDA, C.P.; JULIANO, M.A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L.R. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, v.66, n.2, p.786-793, 1998.

TANG, Q.; BLUESTONE, J.A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. **Nature Immunology**, v.9C, n.3, p.239-244, 2008.

TRINCHIERI G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. **Advances in Immunology**, v.70, p.83-243, 1998.

VIGNA, A.F.; ALMEIDA, S.R.; XANDER, P.; FREYMÜLLER, E.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Granuloma formation in vitro requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen. **Microbes Infect**, v.8, p.589-597, 2006.

VILLADANGOS, J.A.; YOUNG, L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. **Immunity**, v.29, p.352-361, 2008.

VREMEC, D.; POOLEY, J.; HOCHREIN, H.; WU, L.; SHORTMAN, K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. **J Immunol**, v.164, p.2978-2986, 2000.

WANKE, B.; AIDÉ, M.A. Chapter 6: Paracoccidioidomycosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, n.12, p.1245-1249, 2009.

WATTS, T.H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. **Annual Review of Immunology**, v.23, p.23-68, 2005.

WICK, J.M. The role of dendritic cells in the immune response to Salmonella. **Immunology Letters**, v.85, p.99-102, 2003.

WILLIAMS, M.A.; TYZNIK, A.J.; BEVAN, M.J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8 memory T cells. **Nature**. V.441, p.890-893, 2006.

YAMAZAKI, S.; BONITO, A.J.; SPISEK, R.; DHODAPKAR, M.; INABA, K.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. **Blood**, v.110, p.4293-4302, 2007.

YARZÁBAL, L.A.; BOUT, D.; NAQUIRA, F.; FRUIT, J.; ANDRIEUS, S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. **Sabouraudia**, v.15, p.79-85, 1977.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1984. 718p.

8. ANEXOS

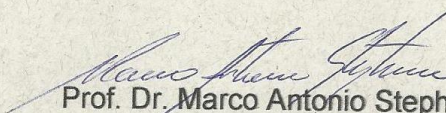


UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUAOfício CEUA/FCF/74/2011CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Caracterização fenotípica de células dendríticas trasfectadas com scFv obtido a partir de anticorpo monoclonal anti-idiotípico Ab2- β , que mimetiza o antígeno gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis*" (Protocolo CEUA/FCF/321), de responsabilidade da pesquisadora **Grasielle Pereira Jannuzzi** sob a orientação do Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 01 de agosto de 2011.

São Paulo, 02 de agosto de 2011.



Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUAOfício CEUA/FCF/118/2012

São Paulo, 06 de novembro de 2012.

Ilmo(a) Sr(a).
Grasielle Pereira Jannuzzi
Profa. Dra. Karen Spadari Ferreira
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP, em reunião realizada em 05 de novembro de 2012, **aprovou** as alterações do projeto "Caracterização fenotípica de células dendríticas trasfectadas com scFv obtido a partir de anticorpo monoclonal anti-idiotípico Ab2- β , que mimetiza o antígeno gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis*" para (Protocolo CEUA nº 321), no que consiste na solicitação de 148 camundongos da linhagem BALB/c fêmeas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

12/08/13

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 7493581/1 - Grasielle Pereira Jannuzzi

Email: grasijannuzzi@usp.br
Data de Nascimento: 20/07/1989
Cédula de Identidade: RG - MG-13.065.991 - MG
Local de Nascimento:
Nacionalidade:
Graduação: Bacharel em Biomedicina - Centro Universitário do Sul de Minas - Minas Gerais - Brasil - 2011

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 21/02/2011
Início da Contagem de Prazo: 21/02/2011
Data Limite: 21/08/2013
Orientador: Prof(a). Dr(a). Sandro Rogerio de Almeida - 21/02/2011 a 08/12/2011 E.Mail: sandroal@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Karen Spadari Ferreira - 09/12/2011 até o presente. E.Mail: karenf@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/02/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 10/04/2012
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 21/02/2011
 Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2013

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2013

Impresso em: 12/08/13 18:19:51

12/08/13

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 7493581/1 - Grasielle Pereira Jannuzzi

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793-10/1	Tópicos em Análises Clínicas I	15/03/2011	27/06/2011	30	2	90	A	N	Concluída
BMM5803-2/2	Fundamentos de Biologia Molecular Bacteriana (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	23/03/2011	03/05/2011	60	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
BMP5773-2/1	Bases Imunológicas da Relação Parasita-Hospedeiro (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/04/2011	19/05/2011	120	8	75	B	N	Concluída
MIP5737-1/4	Fundamentos da Citometria de Fluxo - Aplicações na Investigação da Relação Hospedeiro-Parasita (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	23/05/2011	29/05/2011	30	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5757-3/2	Tópicos em Análises Clínicas II	09/08/2011	29/11/2011	30	2	78,5	A	N	Concluída
FBC5803-1/4	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	09/08/2011	22/08/2011	30	2	100	A	N	Concluída
BMI5883-3/1	Inflamação e Apresentação de Antígenos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	15/08/2011	28/08/2011	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5102-2/5	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	15/08/2011	25/09/2011	60	4	100	A	N	Concluída
EDM5102-2/6	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	18/08/2011	28/09/2011	60	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
EDM5791-5/7	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	23/08/2011	14/11/2011	120	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
MPT5760-4/1	Metodologia de Ensino I: Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	26/08/2011	27/10/2011	90	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
FBA5728-3/3	Aprimoramento Didático	12/09/2011	09/10/2011	60	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5707-5/3	Infecção Hospitalar: Recursos Laboratoriais Tradicionais e Avançados na Investigação, Epidemiologia, Profilaxia e Controle	26/09/2011	16/10/2011	75	0	0	-	N	Matricula cancelada
MAN5728-2/2	Bases Metodológicas da Pesquisa Científica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	03/10/2011	27/11/2011	120	0	0	-	N	Matricula cancelada
FBC5748-3/3	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	24/04/2012	05/06/2012	60	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
BMM5895-	Micoses Sistêmicas Emergentes e Re-emergentes: Análise Crítica com Ênfase no								

<https://uspdigital.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImpressao.jsf>

2/3

12/08/13

Ficha do Aluno

1/1	Diagnóstico Laboratorial (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	07/05/2012	03/06/2012	60	4	80	A	N	Concluída
FBC5734- 2/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	06/08/2012	12/08/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5727- 2/2	Tópicos Avançados da Imunidade Inata Induzida por Fungos Patogênicos	09/10/2012	12/11/2012	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	30
Estágios:			
Total:	0	25	30

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2013

Impresso em: 12/08/13 18:19:51