MARCELO VALDEMIR DE ARAÚJO

Incorporação do peptídeo sintético (P10) de *Paracoccidioides brasiliensis* em lipídeo catiônico (DDA) e sua ação sobre a resposta imune em camundongos C57Bl/6 e BALB/c infectados com *P. brasiliensis.*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2019

MARCELO VALDEMIR DE ARAÚJO

Incorporação do peptídeo sintético (P10) de *Paracoccidioides brasiliensis* em lipídeo catiônico (DDA) e sua ação sobre a resposta imune em camundongos C57Bl/6 e BALB/c infectados com *P. brasiliensis.*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Araujo, Marcelo Valdemir de
Incorporação do peptídeo sintético (P10) de Paracoccidioides brasiliensis em lipídeo catiônico (DDA) e sua ação sobre a resposta imune em camundongos C57Bl/6 e BALB/c infectados com P. brasiliensis / Marcelo Valdemir de Araujo; orientador Carlos Pelleschi Taborda. -- São Paulo, 2019.
117 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Micose pulmonar. 2. paracoccidioidomicose. 3. infecção fúngica. 4. lipídeo catônico. 5. DDA/TDB. I. Taborda, Carlos Pelleschi, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcelo Valdemir de Araújo

Título da Dissertação/Tese: Incorporação do peptídeo sintético (P10) de *Paracoccidioides brasiliensis* em lipídeo catiônico (DDA) e sua ação sobre a resposta em camundongos C57Bl/6 e BALB/c infectados com *P. brasiliensis.*

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Presidente: Assinatura: .....

Nome.....

Instituição.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **101** nas fls. **23** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Carlos Pelleschi Taborda,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeito imuno-estimulador do Peptídeo Sintético (P10) em macrófagos, células NK1.1 e linfócitos T CD4+ e CD8+ de camundongos BALB/c e B10.A infectados com o isolado virulento Pb18 do Paracoccidioides brasiliensis.*" do qual participam o(s) aluno(s) **Marcelo Valdemir de Araújo,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **01.12.2014, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 02 de dezembro de 2014.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.210.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **101/2014/CEUA**, de 01/12/2014, aprovo a inclusão dos animais abaixo indicados ao Protocolo ***"Efeito imuno-estimulador do Peptídeo Sintético (P10) em macrófagos, células NK1.1 e linfócitos T CD4+ e CD8+ de camundongos BALB/c e B10.A infectados com o isolado virulento Pb18 do Paracoccidioides brasiliensis"***, de responsabilidade do Prof. Dr. **Carlos Pelleschi Taborda**, do Departamento de Microbiologia, utilizando as mesmas metodologias aprovadas na proposta inicial:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Mus musculus	C57BL/6j	Macho	6-8 semanas	300

São Paulo, 27 de novembro de 2017.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.120.2018

São Paulo, 17 de dezembro de 2018.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado ***"Efeito imuno-estimulador do Peptídeo Sintético (P10) em macrófagos, células NK1.1 e linfócitos T CD4+ e CD8+ de camundongos BALB/c e B10.A infectados com o isolado virulento Pb18 do Paracoccidioides brasiliensis."***, registrado sob o protocolo nº ***101/2014*** e aprovado em 01/12/2014 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 01/12/2022**, sem a inclusão de novos animais no projeto citado acima.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora - CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Carlos Pelleschi Taborda**
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas da USP

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.110.2019

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **101/2014/CEUA**, aprovado em 01/12/2014, e prorrogado até 01/12/2022, por solicitação do Prof. Dr. ***Carlos Pelleschi Taborda***, do departamento de Microbiologia, informo que o título do projeto do aluno de doutorado ***Marcelo Valdemir de Araújo*** foi alterado para: "***Incorporação do peptídeo sintético (P10) de P. brasiliensis com lipídeo catiônico e sua ação sobre a resposta imune em camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com Paracoccidioides brasiliensis***" pelo estudo estrutural dos componentes presentes na imunização (peptídeo e adjuvante) que se fizeram muito importantes para o andamento do projeto.

São Paulo, 24 de junho de 2019.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Ao Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda pela oportunidade a mim concedida de realizar este trabalho, e por sua orientação.

A minha família por apoiar minhas decisões, em especial minha Tia Antonia Araújo, por me receber em sua casa.

Ao Professor Doutor Alexandre Keller da UNIFESP, pela colaboração e orientação.

Á Profa Kelly Ishida pelas discussões, colaborações e amizade.

Á querida especialista Zita Gregório, pelos auxílios, colaborações, mas principalmente por seu carinho e afeto que me incentivaram nos dias sombrios.

Á minha amada amiga e "esposa" Dra Cristina Spadari que me auxiliou nas discussões, que me incentivou, me apoiou e acreditou em mim em todos os momentos, um verdadeiro esteio nas horas amargas.

Aos amigos de laboratório Julian Esteban, Mariana Doprado, Eluzia Peres, Marta Uran, Ana Camila, Lucas Dias, Jane Kaiano, Viviane Bressani que deixaram o laboratório durante minha estadia nele, seus ensinamentos e orientações foram de grande importância para o direcionamento deste trabalho.

Aos amigos de laboratório Camila Boniche, Cleison Taira, Leandro Buffoni, Luciana Thomaz, Agata Nogueira por toda a ajuda técnica e científica, e dedicação.

Aos queridos Aline Santana e Samuel Rodrigues pelos almoços descontraídos, ajuda técnica, á todas a risadas e besteiras que minimizaram e alegram períodos de tensão.

A querida Dra Suelen Rossi que a pouco chegou no laboratório e nos auxiliou em vários momentos, por seu carinho, por sua atenção e suas orientações (e por ter deixado eu ficar na sua casa na praia).

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação e do departamento de Microbiologia do ICBII/USP, especialmente à Gisele Santana pelo apoio administrativo e pelas orientações que ajudaram a manter o trabalho na linha.

Ao Marco Alves, bioterista, que ajudou na manutenção e cuidado dos animais utilizados nesse trabalho, obrigado pelo trabalho e pela dedicação.

A Adilamar do biotério da Faculdade de Medicina da USP pelo auxílio no pedido de animais.

A todos os funcionários do Instituto de Biociências portaria, segurança, limpeza e biblioteca por manter as condições de trabalho para que pudesse realizar o trabalho sem preocupação.

Aos companheiros Antonio Manucci, Lutero Hasenkamp e Phelipe Eduardo por me aturarem em casa nos momentos de alegria e de loucura.

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

Á FAPESP e CNPQ pelo auxílio à pesquisa concedidos, possibilitando a realização e elaboração deste trabalho.

“Tudo flui...nenhum homem pode banhar-se no mesmo rio por duas vezes, porque nem o homem, nem a água do rio serão os mesmos”.

Heráclito

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de ocorrência de PCM na América do Sul e Latina. 21
Figura 2: Ciclo de infecção proposto para *Paracoccidioides* spp. em humanos 21
Figura 3: Esquema ilustrativo dos lipossomas de DDA, DODAB e DDA/TDB.....35
Figura 4: Fluxograma das estratégias utilizadas para fenotipagem das populações pulmonares. 49
Figura 5: Fluxograma de estratégias identificação das população de linfócitos.....50
Figura 6: Contagem de UFCs dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/P10 ...53
Figura 7: Determinação dos níveis de citocinas do homogenato pulmonar dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/P10.....55
Figura 8: Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/P10 57
Figura 9: Ensaio de linfoproliferação dos linfócitos poplíteos e inguinais dos animais C57Bl/6 imunizados com DDA/P10 58
Figura 10: determinação da carga fúngica do pulmão dos camundongos C57Bl/6 imunizados com construções supramoleculares de DDA/CMC/P10 62
Figura 11: Determinação dos níveis de citocinas do homogenato pulmonar dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/CMC/P10.....63
Figura 12: Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/CMC/P10 65
Figura 13: Linfoproliferação dos linfócitos dos linfonodos poplíteos e inguinais dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/CMC/P10.....66
Figura 14: MET das vesículas lipossômicas de DDA/TDB e DDA/TDB/P10.....68
Figura 15: Contagem de UFC dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados de DDA/TDB/P10. 70
Figura 16: Determinação dos níveis de citocinas do homogenato pulmonar dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10.....71
Figura 17: Determinação dos níveis de citocinas Th17 do homogenato pulmonar dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10.....72
Figura 18: Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10 73
Figura 19: Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10 coloração de GROCOTT. 74
Figura 20: Ensaio de linfoproliferação dos linfonodos poplíteos e inguinais na imunização com DDA/TDB/P10 75
Figura 21: Fenotipagem das populações pulmonares dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10 77
Figura 22: Análise de moléculas co-estimulatórias das células pulmonares dos camundongos C57Bl/6 78
Figura 23: Identificação das populações de macrófagos duplo positivo M1/M2 79
Figura 24: Cinética das moléculas CD80 e CD86 dos macrófagos M1/M2.....80

Figura 25: Análise das populações de células NK nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10 81
Figura 26: Cinética dos linfócitos $CD4^+$ nos pulmões dos animais imunizados com DDA/TDB/P10 ...81
Figura 27: Correlação entre os linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ dos pulmões dos animais C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10 82
Figura 28: Contagem das UFC dos animais BALB/c imunizados com P10 e α-GalCer via intranasal ..84
Figura 29: Quantificação dos níveis de citocinas Th1 eTh2 do homogenato pulmonar dos camundongos BALB/c imunizados com P10 e α-GalCer via intranasal 85
Figura 30: Análise histológica dos pulmões dos camundongos BALB/c imunizados com α-GalCer/P10 86
Figura 31: Avaliação da resposta linfoproliferativa dos linfonodos cervicais, poplíteos e inguinais ..87
Figura 32: Análise das UFCs dos pulmões dos camundongos BALB/c no tratamento intranasal associado ao tratamento antífungico 88
Figura 33: Quantificação das citocinas no homogenato pulmonar dos animais tratados com α-GalCer associado ao tratamento com Bactrin 89
Figura 34: Quantificação de citocinas pró-inflamatórias do homogenato pulmonar dos camundongos tratados com α-GalCer associado ao tratamento antifúngico Bactrin 90
Figura 35:Contagem das UFCs dos pulmões dos camundongos BALB/c imunossuprimido com dexametasona 91
Figura 36: Quantificação das citocinas Th1 e Th2 do homogenato pulmonar dos camundongos BALB/c imunossuprimidos 92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – Antigen Presenting Cells (Células apresentadoras de antígeno)

CAF01 – Cationic Adjuvant Formulation (Formulação Adjuvante Catiônico)

CD – Cluster of Diferentiation (cluster de diferenciação)

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CFA – Complete Freund Adjuvant (Adjuvante completo de Freund)

CFSE – Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (Éster succinimidílico de carboxifluoresceína)

CLR – C-type Lectin Receptor (Receptor lectina tipo C)

ConA – Concanavalina A

DC – Dendritic Cell (célula dendrítica)

DDA – Dioctadecil Dimetil Amônio

DDA/TDB – Dioctadecil Dimetil Amônio / Trealose Dibehenato

DMSO – Dimetilsulfóxido

DODAB BF –Dioctadecyldimethylammonium bromide Bilayer Discks (Fragmentos de bicamada de Brometo de dioctadecildimetil amônio)

DPI –Dias pós infecção

DTH – Hipersensibilidade do Tipo Tardio

Dz – Diâmetro médio

EE – Eficiência de Encapsulamento

GP – Glicoproteína

GM – CSF – Granulicyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (Fator estimulador de colônia de macrófago-granulócito)

H.E. – Hematoxilina Eosina

HSP – Heat Shock Protein (Proteína de choque térmico)

ICB/USP – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IFN – Interferona

LbL – Layer by Layer (camada por camada)

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MFI – Mean Fluorecence Intensity (Intensidade média de fluorescência)

MHC – Major Histocompatibility Complex (Complexo de histopatocompatibilidade principal)

MPL – Monofosforil Lipidio A

NK – Natural Killer

NKT – Natural Killer T receptor (Natural Killer com receptor de linfócito T)

NLR – NOD-like receptors (Receptor tipo NOD)

P10 – Peptídio Sintético

PAMP – Pathogen-Associated Molecular Pattern (Padrão molecular associado ao patógeno)

Pb18 – *Paracoccidioides Brasiliensis* isolado 18

PBS – Phosphate-Buffered Saline (Tampão fosfato salina)

PCM – Paracoccidioidomicose

PDDA – Poli (cloreto de dialil dimetil amônio)

Pdi – Polidispersião

PRR – Pattern Recognition Receptor (Receptor de Reconhecimento Padrão)

RLR – RIG-I-like Receptor (Receptor tipo I-RIG)

RPMI – Roswel Park Memorial Institute

SNC – Sistema Nervoso Central

T-*cra* – Antigen of *Taenia crassiceps* (antígeno de *Taenia crassiceps*)

TDB – Trealose Dibehenato

TDM – Trealose Dimicolato

TGF- Tumor Growth Factor (Fator de crescimento tumoral)

Th – T helper cells

TLC – Thin Layer Chromatography (Cromatografia de camada delgada)

TLR – Toll-like Receptor (Receptor tipo-Toll)

TNF – Tumor Necrosis Factor (Fator de necrose tumoral)

VPL – Virus-like Particle (Partícula tipo-vírus)

α-GalCer – alpha-Galctosylceramide (alpha-galctosilceramida)

SUMÁRIO

Sumário

1 Introdução _____ **20**

1.1 Representação clínica _____ **23**

1.2 Imunologia da paracoccidioidomicose _____ **24**

1.3 Terapêutica _____ **28**

1.4 Peptídeo (P10) _____ **29**

1.5 Adjuvante _____ **31**

1.6 α,α Trealose 6'6 dibehenato (TDB) _____ **34**

1.7 α-galactosil ceramida _____ **36**

2 Justificativa _____ **37**

3 Objetivos _____ **38**

3.1 Objetivo geral _____ **38**

3.2 Objetivos Específicos _____ **38**

4 Material e métodos _____ **39**

4.1 Animais _____ **39**

4.2 Síntese e Purificação do Peptídeo (P10) _____ **39**

4.3 Carboximetilcelulose (CMC) _____ **39**

4.4 Trealose dibehenato _____ **40**

4.5 Lipídeo Catiônico (DODAB) 40

4.6 α-galactosil ceramida 40

4.7 Preparação dos lipossomas 40

4.8 Determinação do tamanho do lipossoma e potencial zeta 41

4.9 Eficiência de encapsulamento 41

4.11 Fungo e infecção 42

4.12 Imunização 43

4.13 Tratamento antifúngico 43

4.14 Imunosupressão 44

4.15 Linfoproliferação 44

4.16 Avaliação do tratamento por meio da determinação da carga fúngica 45

4.17 Isolamento das células pulmonares 46

4.18 Análise histopatológica dos pulmões 46

4.19 Quantificação dos níveis de citocinas do homogenato pulmonar pelo método de ELISA 47

4.20 Citometria de fluxo para caracterização das populações celulares 47

4.21 Análises estatísticas 50

5 Resultados 51

6.Capítulo 1 – Análise do complexo DDA/P10 52

6.1 Propriedades físicas do arranjo DDA/P10 52

6.2 Determinação da carga fúngica nos pulmões dos camundongos imunizados com DDA/P10 54

6.3 Quantificação dos níveis de citocinas no homogenato pulmonar _____ 55

6.4 Análise histopatológica das lesões pulmonares _____ 57

6.5 Linfoproliferação _____ 58

7. - Capitulo 2 Análise das estrutura supramolecular de DDA/CMC/P10 _____ 60

7.1 Propriedades físicas do arranjo DDA/CMC/P10 _____ 60

7.2 Determinação da carga fúngica _____ 63

7.3 Determinação dos níveis de citocina pelo método de ELISA _____ 64

7.4 Análise histopatológica das lesões pulmonares _____ 65

7.5 Ensaio de linfoproliferação _____ 67

8. Capítulo 3 analise da incorporação da trealose nos lipossomas de DDA e adsorção do peptídeo P10 _____ 69

8.1 Incorporação da Trealose dibehenato ao DDA e P10 _____ 69

8.2 Quantificação de adsorção do peptídeo ao lipossoma _____ 71

8.3 Determinação da carga fúngica nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18 e imunizados com DDA/TDB/P10 _____ 71

8.4 Quantificação dos níveis de citocinas no macerado pulmonar pelo método ELISA _____ 73

8.5 Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10 _____ 75

8.6 Linfoproliferação _____ 77

8.7 Avaliação das populações celulares pulmonar _____ 78

9. Capítulo 4 Efeito do agonista α-GalCer sobre a imunização com peptídeo P10 85

9.1 Análise do efeito imunoestimulador do glicolipideo α-GalCer (α- galactosilceramida) sobre

o peptídeo P10 _____ 85

9.2 Avaliação da resposta imune induzida pela associação α-GalCer/P10 via intranasal ___ 85

9.3 Análise da imunização intranasal com o glicolipídio α-GalCer e tratamento antifúngico com sulfamethoxazol/trimetoprim (Bactrin) _____ 89

9.4 avaliação da resposta imune provocada pela α-GalCer em camundongos imunossuprimidos e infectados com Pb18 _____ 93

10. Discussão _____ 95

11. Conclusão _____ 105

Referências bibliográficas _____ 106

Resumo

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica granulomatosa cujo agente etiológico é o fungo termodimórfico *Paracoccidioides* spp.. A doença é amplamente distribuída pela América Latina com maior número de casos no Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia. Atinge principalmente trabalhadores rurais trazendo importantes repercussões econômico-produtivas dos indivíduos acometidos. A PCM apresenta três quadros clínicos: forma assintomática, aguda ou subaguda (tipo juvenil), e crônica (tipo adulto). O antígeno imunodominante de *Paracoccidioides brasiliensis* é a gp43, onde um trecho específico de 15 aminoácidos, designado como P10, é reconhecido pelos linfócitos T desencadeando uma resposta pró- inflamatória contra a infecção fúngica. O presente estudo, avaliou a utilização do adjuvante a base de lipídeo catiônico (DDA) com o peptídeo sintético P10. Os resultados mostraram que o adjuvante sozinho tem pouca estabilidade e baixa imunogenicidade, a adição da carboximetilcelulose (CMC) aumentou a estabilidade do complexo DDA/CMC/P10, porém sem indução de resposta imune protetora devido as baixas concentrações dos componentes. A incorporação da trealose dibehenato (TDB) aumentou as características físico-químicas e imunogênicas do DDA e do peptídeo P10 refletindo na diminuição da carga fúngica nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18, induzindo robusta resposta imune celular com altos níveis de citocinas pró inflamatórias Th1/Th17. O estudo demonstrou também que a utilização do glicolipídeo

Palavras chave: vacina fúngica, micose pulmonar, paracoccidioidomicose, adjuvante, DDA/TDB

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a granulomatous systemic mycosis whose etiologic agent is thermal dimorphic fungus *Paracoccidoides* spp., the disease is widely distributed in Latin America with the highest number of cases in Brazil, Argentina, Venezuela, and Colombia. It reaches mainly rural workers bringing important economic-productive repercussions of affected individuals. PCM presents three clinical manifestations: asymptomatic, acute or subacute (juvenile type), and chronic (adult type). The immunodominant antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* is gp43, a glycoprotein of 416 amino acids, where a specific stretch of 15 amino acids, designated as P10, is recognized by T lymphocytes triggering a pro-inflammatory response against the fungal infection. Previous studies have shown that immunization with P10 associated with some adjuvants decreases fungal load in the lungs of mice and increases levels of cytokines in homogenate pulmonary. The present study evaluated the use of adjuvant based on cationic lipid (DDA) with synthetic peptide P10. The results showed that adjuvant alone has not stability even in the presence of carboxymethylcellulose (CMC) which led to greater stability of DDA/CMC/P10 complex but without immunogenicity. The incorporation of dibehenate trehalose (TDB) increased the stability and immunogenic characteristics of DDA and P10 peptide by decreasing the fungal load of lungs of C57Bl/6 mice infected with Pb18, inducing a robust cellular immune response with high levels of Th1/Th17 proinflammatory cytokines.

Keywords: fungal vaccine, pulmonary mycosis, paracoccidioidomycosis, adjuvant, DDA/TDB

1 Introdução

A paracoccidioidomicose (PCM), é uma micose sistêmica granulomatosa que tem como agente etiológico o fungo *Paracoccidioides* spp. Os fungos deste gênero são termo dimórficos, e podem ser cultivados como micélio ou levedura (MENDES et al., 2017). São encontrados no solo provavelmente na forma de micélio saprófita, e quando inalados e depositados nos alvéolos pulmonares podem transformar se em leveduras (BOCCA et al., 2013).

Descrito por Almeida em 1930, o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) foi considerado uma única espécie por aproximadamente 75 anos (revisado por TURISSINI et al., 2017). No entanto, estudos moleculares e morfológicos forneceram dados suficientes para dividir *P. brasiliensis* em duas espécies: *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, este é composto por um clado monofilético simples e por recombinação populacional, encontrado nas regiões sudeste, central e norte do Brasil e no Equador (TEIXEIRA et al., 2013, 2009).

A utilização de taxonomia molecular levou à identificação de 5 espécies filogenéticas: *Paracoccidoides lutzii* e quatro espécies do complexo brasiliensis (MATUTE et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2013, 2009; THEODORO et al., 2012). As espécies reconhecidas como PS3 (restrita à Colômbia), PS2 e S1 (com ampla distribuição geográfica pela América do Sul); por fim análises moleculares levaram à identificação de mais uma espécie, PS4 (restrita à Venezuela) (TEIXEIRA et al., 2009, 2014).

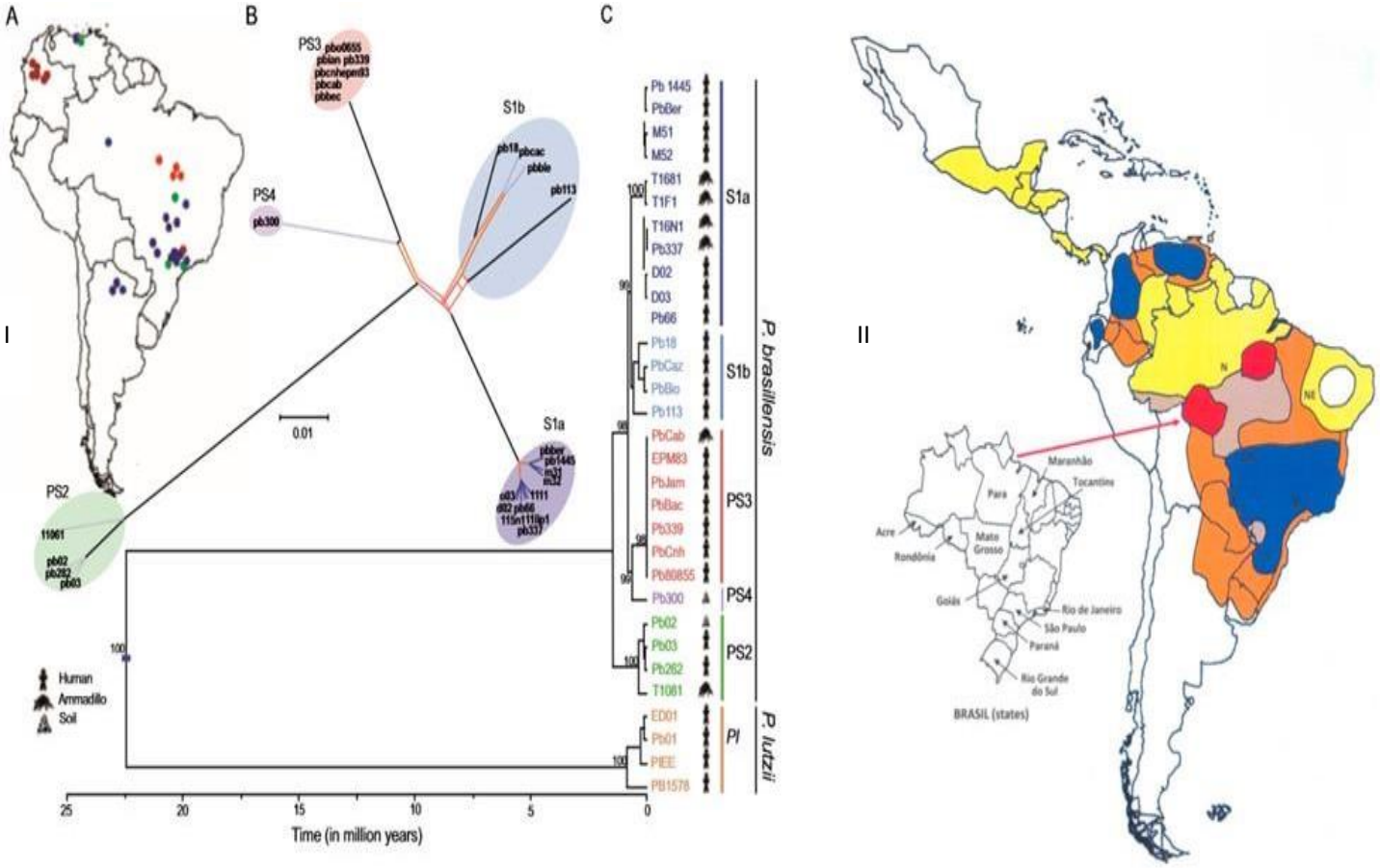
Turissini et al., 2017, analisaram genes nucleares e mitocondriais e demonstraram diferenças nas árvores genéticas das espécies de *P. brasiliensis*; seus resultados indicaram que as espécies estudadas, raramente trocam alelos entre si, são altamente simpátricas e com chance de se cruzarem. Foi demonstrado que as quatro espécies do complexo brasiliensis diferem na morfologia da levedura e que cada espécie pode ser identificada por análise molecular e morfológica; foi então proposto o reconhecimento taxonômico de três novas espécies de *Paracoccidioides: P. americana* para PS2, *P. restripiensis* para PS3 e *P. venezuelensis* para PS4 (TURISSINI et al., 2017).

A PCM ocorre na maioria dos países da América Latina, com zona endêmica extensa de Tampico, no Sul do México, a província Buenos Aires, na Argentina (Figura 1) (ELMER et al.,1993; QUEIROZ-TELLES et al., 2011), é considerada a mais importante infecção

sistêmica fúngica da América do Sul, com maior incidência no Brasil (80% dos casos), Colômbia, Venezuela, seguido por Argentina, Peru, Equador, Uruguai e Paraguai (COLOMBO et al., 2011; QUEIROZ-TELLES et al., 2011).

O Chile é o único país da América do Sul onde não há relato de caso autócones, devido às condições climáticas que não favorecem a sobrevivência do fungo (MENDESet al., 2017). No Brasil, há uma extensa área endêmica que predomina nas regiões central e sudeste do país, a prevalência da doença é maior entre a população rural envolvida com atividades agrícolas (FERREIRA, 2009).

Figura 1: Mapa de ocorrência de PCM na América do Sul e Latina.



(I) Filogênia do gênero Paracoccidioides na América do Sul, incidência por região das espécies *P. brasiliensis* (S1), *P. restrepensis* (PS3), *P. venezuelensis* (PS4), *P. americana* (PS2) e *P. lutzii* (PL) e sua divergência genética ao longo do tempo (adapatado de Mendes et al.,2017) (II) áreas de endemicidade da PCM na América Latina, (azul) primeira área de maior incidência reconhecida, (vermelho) área de alta incidência observada nas últimas décadas, (marrom claro) área com aumento crescente de casos (amarelo ouro) área de incidência moderada, (amarelo) baixa incidência e (sem cor) incidência rara (Martinez, 2017).

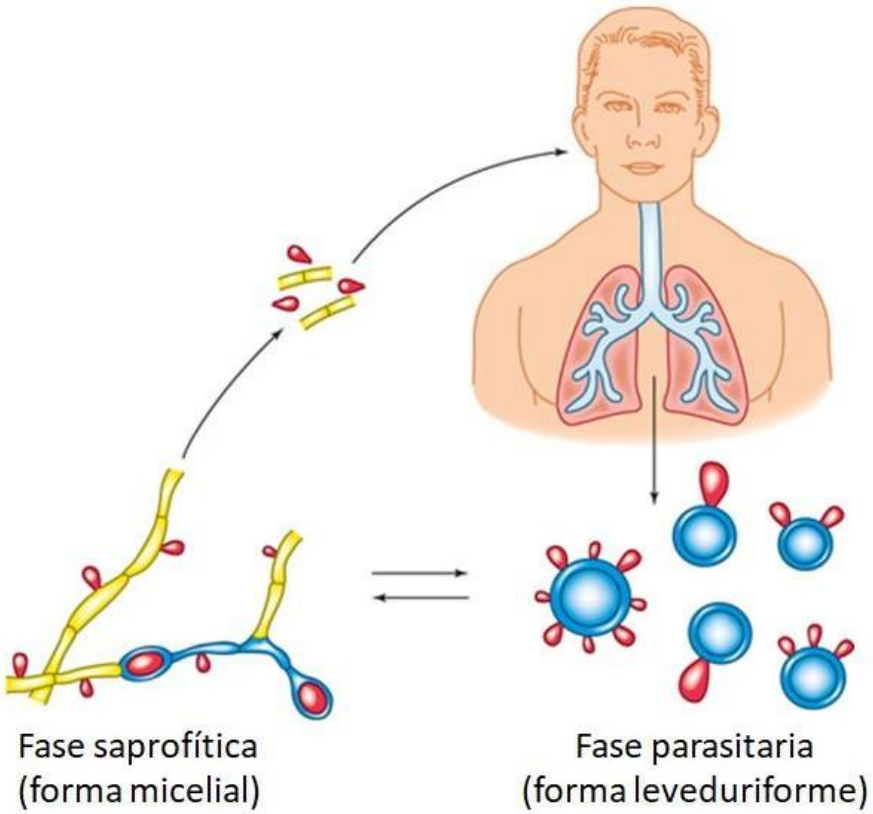
A infecção pode tornar se uma doença muito severa. No Brasil, é uma das principais causas de mortes por micose sistêmica em pacientes imunocomprometidos, e a décima em causa de mortes por doenças infecciosas e parasitárias (MARQUES, 2012). Acredita-se que sua incidência em zonas endêmicas seja de 3 a 4 novos casos/milhão até 1 a 3 novos casos por 100 mil habitantes por ano (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Fortes,

Miot, Kurokawa, Marques, & Marques, 2011).

Na natureza *Paracoccidioides* spp. desenvolve se com estruturas filamentosas e produz propágulos infectivos chamados de conídios (BATISTA JR et al., 2010;CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017; MACHADO et al., 2013). A infecção do hospedeiro ocorre frequentemente pela inalação do conídio e fragmentos de micélio (Figura 2) , que alcançam os bronquíolos terminais e alvéolos, onde transformam se em leveduras produzindo uma infecção que pode disseminar se para outros tecidos via linfática ou hematogênica (FORTES et al., 2011a).

A PCM é um processo infeccioso sistêmico que pode envolver diferentes órgãos e sítios anatômicos, especialmente o pulmão, membranas mucosas, pele, linfonodo, sistema nervoso central (SNC), glândulas adrenais (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; NEGRONI, 1993; NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009; QUEIROZ-TELLES; ESCUISSATO, 2011).

Figura 2: Ciclo de infecção proposto para *Paracoccidioides* spp. em humanos.



Os propágulos (fragmentos e conídios) do fungo na forma saprofítica (micelial) encontrada no solo, podem ser inalados e depositados nos alvéolos pulmonares, onde dependendo da disposição de nutrientes convertem se em leveduras (forma infecciosa ou parasitária) (Adaptado de Bonifaz, Micología Médica Básica 5º Ed. 2015).

1.1 Representação clínica

Todas as espécies de *Paracoccidioides* spp. podem causar PCM, algumas características clínicas diferenciais foram observadas em pacientes infectados com *P. lutzii* ou complexo *P. brasiliensis* (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017; TEIXEIRA et al., 2014). Estudos demonstraram que as infecções reportadas nas áreas endêmicas de *P. Lutzi* frequentemente apresentam manifestações clínicas abdominal-linfáticas, que não são relatadas nas áreas endêmicas do complexo *P. brasiliensis* (MACHADO et al., 2013). Além disso, o soro de pacientes infectados com *P. lutzii* não reconhece integralmente os antígenos de *P. brasiliensis* e vice versa (BATISTA JR et al., 2010; GEGEMBAUER et al., 2014; MACHADO et al., 2013; QUEIROZ JÚNIOR et al., 2014), porém HAHN et al., 2019 demonstraram em estudo realizado com 34 pacientes com PCM causada por *P. lutzii* que o perfil epidemiológico-clínico de PCM causada por *P. brasiliensis* ou *P. lutzii* não exibe diferenças significativas que poderia ser atribuída ás espécies .

Três formas clínicas da PCM são descritas na classificação atual: a infecção assintomática, que ocorre nos pacientes saudáveis que vivem na área endêmica e que apresentam testes cutâneos positivos para a PCM (DE CASTRO et al., 2013). A infecção aguda ou subaguda (tipo juvenil) responsável 5 a 25% dos casos e pode ser mais frequente em algumas regiões endêmicas que em outras. No Brasil, esta forma é mais comumente observada nos estados do Maranhão, Minas Gerais, Pará, Goiás e São Paulo (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). A forma aguda afeta predominantemente crianças, adolescentes e jovens adultos (30 a 40 anos) e tende a ser homogênea entre os gêneros especialmente na população adolescente (BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2013; FABRIS et al., 2014; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Em geral desenvolve se a partir de lesão primária pulmonar não detectada, que progride rapidamente com disseminação linfática e hematogênica para os órgãos do sistema monocítico-macrofágico como: baço, fígado, linfonodos, ossos e medula óssea; altos títulos de anticorpos específicos e depressão grave da imunidade celular são comumente observados nesse tipo de infecção (BOCCA et al., 2013; DE CASTRO et al., 2013; FORTES et al., 2011b).

A forma crônica da doença (tipo adulta) representa 74% a 96% dos casos de PCM e frequentemente acomete adultos entre 30 e 60 anos de idade (com uma taxa de 22:1 entre homens e mulheres) (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017), desenvolve-se a partir do complexo primário pulmonar ou da reativação de foco quiescente pulmonar. Na maior parte dos casos a infecção tem início nos pulmões e progride lentamente, apresentando quadro clínico de duração prolongada, normalmente acima de seis meses de história clínica, e se expressa frequentemente pelo comprometimento pulmonar e tegumentar (cutâneo e/ou mucoso), as lesões podem permanecer localizadas (subtipo clínico unifocal) ou se disseminar para vários órgãos e sistemas (multifocal), com gravidade

variável (FORTES et al., 2011, BOCCA et al., 2013, DE CASTRO et al., 2013).

1.2 Imunologia da paracoccidioidomicose

O homem é exposto aos fungos ao longo da vida via inalação, digestão ou inoculação traumática das partículas fúngicas. A grande maioria desses encontros é assintomática e menos de 100 das 5 milhões de espécies fúngicas estimadas são associados a doenças em humanos (BROWN et al., 2012; LIONAKIS; ILIEV; HOHL, 2017). O contato com o fungo induz resposta imune inata e adaptativa coordenada para erradicação do fungo e promoção de memória de longa vida (VERMA et al., 2015).

Os fungos são muito proficientes em sentir o ambiente ao seu redor, e responder a essas alterações promovendo sua sobrevivência em mudanças ambientais. Como resultado, eles podem interagir com plantas, animais e homem de múltiplas maneiras estabelecendo relações simbióticas, comensais, latentes ou patogênicas (ROMANI, 2011). O estabelecimento da doença, disseminação e severidade, dependem de fatores inerentes ao fungo como virulência, composição antigênica, condições ambientais e especialmente a habilidade do hospedeiro em desenvolver uma resposta imune efetiva (FORTES et al., 2011b).

O entendimento da imunopatologia da PCM requer o conhecimento histórico do fungo. Acredita se que os propágulos e conídios do fungo inalados, pela manipulação do solo, alcancem os alvéolos pulmonares onde são internalizados por macrófagos residentes. Essa interação parece direcionar o subsequente mecanismo de imunidade inata ou adaptativa que resultará numa infecção localizada ou sistêmica (PINA et al., 2008, RESTREPO et al., 2008).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra fungos são numerosos, e vão de um mecanismo protetor que evoluiu de um organismo multicelular (imunidade inata) a um mecanismo adaptativo sofisticado que é especificamente induzido durante a infecção e doença (imunidade adaptativa) (ROMANI, 2011).

Os mecanismos da resposta imune inata não apenas controlam o crescimento precoce do patógeno, mas também determinam qual tipo de resposta imune adaptativa será desenvolvida pelo hospedeiro infectado. Na PCM foi demonstrado que a resposta imune mediada por células T, tem sido reconhecida como principal mecanismo protetor devido a sua habilidade de secretar citocinas pró-inflamatórias, ativar fagócitos para morte do fungo, exercer efeito citotóxico nas células infectadas, controlar a produção de

anticorpos, e regular a formação do granuloma (CALICH; MHSL;, 2005; CALICH; SINGER-VERMES; RUSSO, 1994).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos e protege amplamente contra micro-organismos invasores. Receptores herdados geneticamente, chamados de receptores de reconhecimento padrão (PRR, do inglês *Pattern recognition receptors*) são usados pelas células do sistema imune inato para reconhecerem moléculas conservadas conhecidas como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP, do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*) (DRUMMOND et al., 2015). Os PRRs podem ser classificados em várias famílias de acordo com sua estrutura e função: receptores de lectina tipo C (CLR, do inglês *C-type lectin receptor*), receptores de tipo *Toll* (TLR, do inglês *Toll-like receptor*), receptores tipo ligação nucleotídica e domínio de oligomerização (NLR, do inglês *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*), receptores do tipo gene induzível de ácido retinóico (RLR, do inglês *RIG-like receptor*) (SALAZAR; BROWN, 2018).

Enquanto a resposta imune inata mediada primeiramente por neutrófilos e macrófagos é suficiente para controlar infecção por alguns fungos, a proteção total contra a maioria dos patógenos requer uma resposta adaptativa que é iniciada pelas células dendríticas com contribuição de outras células como os monócitos (BROWN, 2012; HOHL et al., 2009).

Os macrófagos são muito apreciados por seu papel no balanço de espécies de citocinas efetoras necessárias para o recrutamento e ativação dos neutrófilos assim como aumento ou inibição da imunidade inata (FROMTLING; SHADOMY, 1986; JIANG, 2016). A força da resposta pode ser direcionada pela sinalização dos TLRs, inclusive TLR4 e TLR2 (BOURGEOIS; KUCHLER, 2012; JIANG, 2016), sugerindo que diferentes padrões de sinalização de TLR contribuiriam para diferentes respostas biológicas sobre a infecção fúngica (JIANG, 2016).

Como a infecção primária por *Paracoccidioides* spp. ocorre pela inalação dos propágulos fúngicos, a interação dos macrófagos alveolares residentes pode exercer uma importante influência nos padrão da resposta subsequentemente gerada (LOURES et al., 2012; PINA; BERNARDINO; CALICH, 2008). Em modelo murino, foi observado que os macrófagos de camundongos são permissivos ao crescimento de *P. brasiliensis*, enquanto que macrófagos ativados são capazes de restringir a multiplicação do fungo

(BRUMMER et al., 1988; CANO et al., 1994, 1998; GONZALEZ et al., 2004; PINA et al., 2008).

A habilidade dos macrófagos em impactar o curso da resposta imune é, em grande parte, devido à plasticidade inerente e adaptável dessas células (EDHOLM; RHOO; ROBERT, 2017). De fato, a linhagem de células monócito-macrofágica foi reconhecida como altamente plástica com populações polarizadas que diferem em termos de função efetora, expressão de receptores celulares superficiais e produção de citocinas (EDHOLM; RHOO; ROBERT, 2017; ITALIANI; BORASCHI, 2014). Dois padrões de diferenciações foram bem caracterizados, conhecidos como M1 e M2. Os macrófagos M1(tipo inflamatório ativado classicamente) são caracterizados por seu fenótipo de citocinas pró-inflamatórias, promoção da resposta imune Th1 e atividade fungicida; enquanto que os macrófagos M2 (tipo regenerativo ativado alternativamente) exibem funções regulatórias na reparação dos tecidos, remodelação, perfil de citocinas anti-inflamatórias e promoção da resposta imune Th2 (BARROS et al., 2013)..

As células Natural Killer (NK) também contribuem diretamente na resistência inata às infecções, através de vários mecanismos incluindo: secreção de citocinas pró-inflamatórias e imuno regulatórias, quimiocinas, lise das células do hospedeiro infectadas e morte das células do fungo. Estas células são capazes de controlar uma infecção inicial e induzir a uma resposta imune adaptativa (PINA et al., 2008,LONGHI et al., 2012). O nome natural killer veio de sua habilidade de matar células tumorais *in vitro* e *in vivo* sem estímulo prévio, embora sejam consideradas originalmente células do sistema imune inato, elas demonstram qualidades da imunidade adaptativa como memória imunológica (SCHMIDT; TRAMSEN; LEHRNBECHER, 2017).

As células Natural Killer eliminam seus potenciais alvos tanto diretamente, usando moléculas citotóxicas como perforina ou granzima B, que são estocadas em grânulos ou, pela morte por apoptose mediada por receptores (SCHMIDT; TRAMSEN; LEHRNBECHER, 2017; VIVIER et al., 2008).

O desenvolvimento da imunidade adaptativa é compartilhado pelas células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *Antigen-presenting cell*) que expressam altos níveis de MHC (do inglês, *major histocompatibility complex*), moléculas co-estimulatórias, e mediadores solúveis como citocinas e quimiocinas que direcionam a sinalização do padrão da resposta. Os PRRs melhores descritos para o reconhecimento

fungico e indução de mediadores solúveis são os TLRs e CLRs (VERMA et al., 2015). Os fagócitos processam e apresentam o antígeno fúngico á células T $CD4^+$ naïve em contexto MHC de classe II. Esta interação se inicia com o comprometimento de subgrupos Th efetores. As células dendríticas (DC, do inglês *dendritic cells*) também ativam células T $CD8^+$ pela apresentação do antígeno via MHC classe I. Em contraste ao requerimento de processamento do antígeno para ativação das células T, as células B reagem diretamente ao antígeno fúngico e secretam imunoglobulinas que podem influenciar o resultado da infecção (VERMA et al., 2015).

A resposta imune Th1 é instrumental na defesa do hospedeiro contra patógenos fúngicos, e sua importância foi bem estabelecida em modelos murinos experimentais e em infecções humanas. Depois da exposição, as APCs produzem IL-12 (IL - interleucina) que é crítica para o comprometimento da linhagem Th1. Essas células orquestram resposta imune antifúngica pela liberação de citocinas pró-inflamatórias IFN-γ, TNF-α e GM-CSF. A citocina de assinatura Th1, IFN-γ, manifesta efeito pleiotrópico nas células imunes durante a infecção, induzindo a ativação clássica dos macrófagos que é crítico para o controle do crescimento intracelular de patógenos fúngicos incluindo *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *P. brasiliensis* e *Coccidioides immitis* (BEAMAN, 1987; BRUMMER; STEVENS, 1995; CALVI et al., 2003; SUGAR et al., 1995; VERMA et al., 2015).

A resposta imune Th2 manifesta uma influência prejudicial para o hospedeiro na maioria das infecções fúngicas. Essa resposta é composta de citocinas derivadas de células T $CD4^+$ como IL-4, IL-5 e IL-13 e IgE (Ig - imunoglobulina, secretada pelas células B). A síntese exagerada desses fatores solúveis na maioria das doenças micóticas interfere com a liberação do patógeno, e em raras ocasiões, a falha para regulá-los pode resultar em um desfecho fatal (WÜTHRICH; DEEPE; KLEIN, 2012). A citocina IL-4 é o mais potente sinal para a reatividade da resposta Th2 que prejudica a proteção da resposta Th1 e favorece reações alérgicas fúngica. A IL-4 pode tanto ativar como desativar fagócitos e DCs por certas funções especializadas, podendo inibir a atividade efetora antifúngica dos fagócitos e pode promover a produção de IL-12 pelas DCs (MENCACCI et al., 1998; ROMANI, 2008) .

A paracoccidioidomicose foi bem caracterizada como um polo de resposta imune Th1 para os pacientes infectados assintomáticos que apresentam uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH do inglês *delayed-type hypersensitivity*) e cujos linfócitos

secretam citocinas do tipo IL-2 e IFN-γ. Os pacientes com a forma clínica aguda, ou juvenil, apresentam uma profunda anergia da DTH, seus linfócitos comportam-se como padrão de imunidade dominante do tipo Th2 devido ao aumento na secreção de IL-4, IL-5 e IL-10, anticorpos específicos de subclasses IgE, IgG4 e IgA eosinofilia no sangue periférico e outros padrões. A forma clínica mais comum da PCM é a forma adulta, ou crônica, nos casos onde a PCM apresenta forma mais suave ou modera há uma prevalência da respostado tipo Th1, ao passo que, nos casos mais graves resposta do tipo Th2 é mais proeminentemente observada (PINA et al., 2008, RESTREPO et al., 2008).

Além dos subtipos Th mencionados, classificados por suas características fenotípicas e funções especializadas na imunidade, as células T também podem se diferenciar em células Th17, uma linhagem de células distintas que produz várias citocinas e quimiocinas como TNF-α, IL-6, IL-21, IL-22, IL-17F e IL-17A (LIANG et al., 2006; TRISTÃO et al., 2017; ZAMBRANO-ZARAGOZA et al., 2014).

A liberação de citocina IL-6 mais TGF-β, além de IL-1, IL-21 induz a produção de IL-17 (A e F) e IL-22 pelas células Th17 (ESPINOSA; RIVERA, 2011; KOLLS DEAN SHEPPARD et al., 2017; MCGEACHY; CUA, 2008; ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). Além de requerer várias citocinas para sua diferenciação, as células Th17 necessitam ainda da citocina IL-23 para manutenção e expansão de suas células (VERMA et al., 2015; ZÚÑIGA et al., 2013). As células Th17 são descritas como um braço do sistema imune que aumenta a proteção do hospedeiro contra várias infecções bacterianas intra e extracelular (GRAEBER; OLSEN, 2012). Além disso, as infecções fúngicas podem ser associadas a indução da resposta imune Th17 pelo direcionamento de mecanismos efetores, produção de peptídeos antimicrobianos (CHAN et al., 2009; FERREIRA et al., 2014a; LIANG et al., 2006) e importante fatores para o recrutamento e função dos neutrófilos (LAAN et al., 1999; YE et al., 2001) e promoção da resistência a infecção (HERNÁNDEZ-SANTOS; GAFFEN, 2012; PEREZ-NAZARIO et al., 2013; ROMANI, 2011).

1.3 Terapêutica

A terapia para PCM inclui medidas de suporte às condições clínicas associadas ao envolvimento de diferentes órgãos pela micose, além da terapêutica antifúngica específica. Ao contrário dos outros fungos patogênicos, *P. brasiliensis* e *P. lutzii* são susceptíveis a maioria dos agentes antifúngicos sistêmicos, mesmo derivados de

sulfonamidas podem inibir seu crescimento. Vários antifúngicos podem ser utilizados para o tratamento desses pacientes, tais como anfotericina B, sulfamídicos (sulfadiazina, associação sulfametoxazol/trimetoprim), azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol).

Apesar da limitação das informações disponíveis em estudos comparativos com diferentes esquemas terapêuticos, sugere-se o itraconazol como opção terapêutica que permitiria o controle das formas leves e moderadas da doença em menor período de tempo. Pacientes com formas graves devem receber anfotericina B ou associação sulfametoxazol/trimetoprim por via intravenosa (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

A duração do tratamento relaciona-se à gravidade da doença e ao tipo de droga utilizada. Usualmente, o tratamento é de longa duração, para permitir o controle das manifestações clínicas da micose e evitar as recidivas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006, 2017). A falta de adesão ao tratamento é causa mais comum de falha na terapia (Shikanai-Yasuda, 2015).

1.4 Peptídeo (P10)

A vacinação tem sido o esteio na prevenção de várias doenças infecciosas mortais. Historicamente, as formas inativada e viva-atenuada de patógenos microbianos (vírus, bactérias, *etc*.) tem sido usadas para a indução de resposta antígeno específica que proteja o hospedeiro contra infecções subsequentes (LI et al., 2014). Com base no patógeno utilizado, essas formulações podem conter algo entre dezenas a centenas de proteínas.

Entretanto, a imunidade protetora geralmente depende de algumas proteínas selecionadas e a maioria delas são desnecessárias à indução da imunidade (LI et al., 2014). Uma extensão dessa lógica poderia ser que, qualquer proteínas simples contêm várias centenas de epítopos antigênicos, dos quais a maioria não são necessários; e alguns ainda podem ser prejudiciais a indução da imunidade protetora (LI et al., 2014). Estas características levaram ao interesse por vacinas peptídicas contendo apenas epítopos capazes de induzir positivamente, resposta imune desejável mediada por células B e T (LI et al., 2014; SESARDIC, 1993).

Os peptídeos usados nessas vacinas possuem sequências de 20 a 30 aminoácidos que são sintetizados para formar uma molécula imunogênica representando o epítopo específico do antígeno (LI et al., 2014). Assim, uma vez que os epítopos são determinantes imunogênicos dentro de proteínas maiores, esses peptídeos, são

considerados suficientes para a ativação das respostas celular e humoral apropriadas, enquanto elimina respostas alergênicas e/ou reatogênicas (BIJKER et al., 2007; LI et al., 2014; LIN et al , 2013).

Em PCM, um peptídeo tem se destacado como candidato vacinal gerado a partir de uma glicoproteína. Essa glicoproteína de 43.000 Daltons de massa (gp43), é secretada exocelularmente por *P. brasiliensis*, tanto na fase micelial quanto leveduriforme, e foi primeiramente descrita como uma proteína de adesão por sua capacidade de ligar se aos componentes da matriz extracelular como laminina (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006, SILVA et al., 2003, KONNO et al., 2012). A gp43 prejudica a ingestão de *P. brasiliensis* e a interação fungo-macrófago induzindo a desativação dessa célula (POPI; LOPES; MARIANO, 2002).

A gp43 é o principal antígeno no diagnóstico da PCM (DE CAMARGO et al., 1988; MARQUES DA SILVA et al., 2003). Além de ser imunodominante para a produção de anticorpos, a glicoproteína também contém epítopos peptídicos que induzem hipersensibilidade do tipo tardio (DTH), por este motivo, a molécula tem sido extensivamente estudada como uma possível candidata à vacina antifúngica (TABORDA et al., 1998).

A molécula foi purificada através de imunoafinidade cromatográfica com anticorpos monoclonais, seu gene foi sequenciado e os epítopos envolvidos na reatividade imunológica foram analisados. Os estudos revelaram que a gp43 é um polipeptídeo com estrutura composta por 416 aminoácidos (CISALPINO et al., 1996).

A principal sequência da glicoproteína á induzir uma resposta imune protetora, é um peptídeo composto de 15 aminoácidos (QTLIAIHTLAIRYAN) designado P10 que contém epítopos de células T $CD4^+$ restrito à MHCII capaz de instigar resposta imune celular em camundongos da linhagem BALB/c e outros haplótipos (TABORDA et al., 1998). A imunização utilizando o P10 induziu uma resposta protetora significativa contra o fungo em modelos experimentais de PCM. O P10 induziu a produção de citocinas do tipo Th1 tais como IFN-γ, TNF-α e IL-12, importantes para desencadear uma resposta imune protetora no hospedeiro e poderia ser utilizado como adjuvante terapêutico no tratamento quimioterápico contra infecções fúngicas (TRAVASSOS et al, 2008; BOCCA et al., 2013).

Estudos realizados com P10 em modelo murino, demonstrou que a imunização subcutânea com o peptídeo, em camundongos BALB/c infectados por via intratraqueal com leveduras de Pb18 e tratados com drogas antifúngicas e imunizados com o peptídeo P10, tiveram diminuição na carga fúngica dos pulmões; induziu resposta imune celular com altos níveis de citocinas Th1, principalmente IFN-γ; e impediu recidiva da doença (MARQUES et al., 2006). Em outro trabalho com o peptídeo, camundongos (BALB/c), imunossuprimidos com Dexametasona foram infectados com leveduras de Pb18 e imunizados com P10/CFA (adjuvante completo de Freund) e tratados com drogas antifúngicas. O estudo mostrou que o tratamento com antifúngico aliado á imunização subcutânea com o peptídeo, diminuiu a carga fúngica nos pulmões dos camundongos, aumentou níveis de citocinas Th1, e evitou recidiva (MUÑOZ et al., 2014).

HOLANDA et al., 2017, realizaram um estudo profilático de PCM utilizando vacina recombinante onde o peptídeo foi incorporado a VPL (partículas tipo vírus). Nesse estudo foi utilizado dois candidatos vacinais com a mesma construção de VPL, ambas contento o epítopo células T $CD4^+$ de *P. brasiliensis* (P10), com a porção C-terminal de HBcAg (fusionado como uma sequência flanqueadora de alanina para o aminoácido 179 de HBcAg). A primeira foi uma proteína purificada P10(His_6) (rPbT) e a segunda foi um recombinante vector adenoviral humano tipo 5/P10 (rAdPbT). Ambas construções VPL/P10 levaram a uma diminuição tardia na carga fúngica do pulmão dos camundongos infectados (BALB/c).

A vacina recombinante induziu a produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias das células T $CD4^+$ de memória (fenótipo central e efetor) e verificaram também uma baixa produção de IL-10 em todos os grupos imunizados com a construção derivada de P10. O estudo também mostrou que os camundongos imunizados com adenovírus recombinante foram protegidos contra a disseminação do fungo (HOLANDA et al., 2017).

1.5 Adjuvante

Vacinas peptídicas sozinhas, mesmo aquelas que compreendem epítopos ótimos para células B e T, são pobremente imunogênicas e requerem adjuvantes e sistema de entregas apropriados para serem efetivas (LI et al., 2014). Vários sistemas foram

estudados para entrega eficiente de peptídeos candidatos vacinais. Sistemas de entregas em particular, tem como objetivo sobrepor a deficiência do antigo adjuvante Alum (LI et al., 2014).

O termo adjuvante (do latin *adjuvare* significa “ajudar”) descrito por Ramon como “substâncias usadas em combinação com um antígeno específico e que produz resposta imune mais robusta que o antígeno sozinho” (AWATE; BABIUK; MUTWIRI, 2013; RAMON, 1924). Diversas classes de componentes são avaliadas como adjuvantes incluindo sais minerais, produtos microbianos, emulsões, saponinas, citocinas, polímeros, micro partículas e lipossomas (AWATE; BABIUK; MUTWIRI, 2013; GUY, 2007).

Os lipossomas são compostos de fosfolipídios, que auto se associam, formando esferas de bicamadas lipossômicas com um núcleo aquoso. Anfifílico de natureza, os fosfolipídios resultam em uma concha polar em soluções aquosas devido ao efeito hidrofóbico das cadeias acilas com o meio aquoso circundante. Essa formação é termodinamicamente favorável e reforçada pelas pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e outras forças eletrostáticas (ISRAELACHVILI; MARCELJA; HORN, 1980; LASIC, 1998; PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015).

Os lipossomas foram descritos pela primeira vez em 1961 (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965) como vesículas artificiais lipossômicas, foram reconhecidas e extensivamente utilizadas como sistema de entregas para fármacos (KARMALI; CHAUDHURI, 2007), como micro reatores químicos (LEMIÈRE; CARVALHO; SYKES, 2015; SERCOMBE et al., 2015; V; AN, 2014) e como modelo de sistema de biomembranas (MOURITSEN, 2011; ZYLBERBERG; MATOSEVIC, 2016).

A função de entrega terapêutica dos lipossomas tem recebido novas abordagens que levaram a estudos na construção dessas estruturas; a atenção é direcionada aos parâmetros biofísicos que podem ser manipulados pela alteração dos constituintes fosfolipídicos da bicamada para melhor adequar o lipossoma à aplicação requerida. Essas abordagens incluem: modificação da bicamada lipossômica com anfifílicos adequados para aumentar o tempo de circulação dos lipossomas, melhorar sua elasticidade ou desenvolver complexo droga-lipídeo covalentes que melhorarem a entrega de fármacos (ZYLBERBERG; MATOSEVIC, 2016).

Os surfactantes com base em quaternário de amônio DDA (dioctadecildimetil amônio), tem sido estudado como lipossomas, entre eles o DODAB (brometo de dioctadecildimetil amônio) (Figura 3) um lipídeo sintético anfifílico composto de um grupo hidrofílico carregado positivamente (dimetil amônio) ligado a duas cadeias hidrofóbicas alquil de 18 carbonos cada uma. As vesículas catiônicas de DDA tem sido usadas como carreadores em sistema de entrega de drogas, bem como, adjuvantes para vacinação com estabilidade coloidal maior que o Alum e com maior eficiência na indução da resposta imune celular (CARNEIRO et al., 2015).

Como parte das subunidades vacinais, os lipossomas podem ser utilizados como veículos de entrega para antígenos. Baseado na suposição de que os lipossomas são capazes de entrega o antígeno às APCs e assim, aumentar a resposta imune antígeno-específica (COX; COULTER, 1997; SMITH KORSHOLM et al., 2007). Diferentemente dos ácidos nucleicos que precisam ser entregues no citosol em terapias gênicas, os antígenos nas subunidades vacinais devem ser degradados no compartimento endossomal para serem apresentados em contexto de moléculas de MHC de classe II na superfície das APCs (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; SMITH KORSHOLM et al., 2007). Nesse contexto, as DCs são importantes por sua habilidade em estimular eficientemente reposta imune primária e estabelecer memória imunológica (SMITH KORSHOLM et al., 2007; STEINMAN; POPE, 2002).

O mecanismo de ação por trás do efeito do adjuvante de DDA foi atribuído a sua habilidade de associar antígenos (HILGERS et al., 1985), prolongar a deposição de antígeno no sítio de injeção (HENRIKSEN-LACEY et al., 2011) e aumentar aquisição celular do antígeno, talvez através da atividade da endocitose dependente de actina (CHRISTENSEN et al., 2011; SMITH KORSHOLM et al., 2007).

Os fragmentos de bicamada de DODAB (BF) (Figura 3), foram utilizados como adjuvantes para antígenos de *Taenia crassiceps* (18/14-*tcra*) e antígeno recombinante de choque térmico *hsp*18/KDa de *Mycobacterium leprae*. Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados por via subcutânea no abdômen e desafiados com o antígeno puro no coxim plantar 5 dias após a imunização. Foi avaliado então a DTH, quantificado os níveis de citocinas e produção de anticorpos. Os estudos mostraram que os grupos imunizados com o antígeno associado ao adjuvante (DODAB BF) produziram resposta imune celular

protetora com produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1 e produção de anticorpos protetores IgG (LINCOPAN et al., 2009a).

Estudos demonstraram que o nível e a qualidade de proteção da resposta imune induzida pelos lipossomas de DDA podem ser extensivamente aumentados pela incorporação de imunoestimuladores tais como monofosforil lipídio A (MPL), trealose dibehenato (TDB), e Poly I:C (CHRISTENSEN et al., 2011).

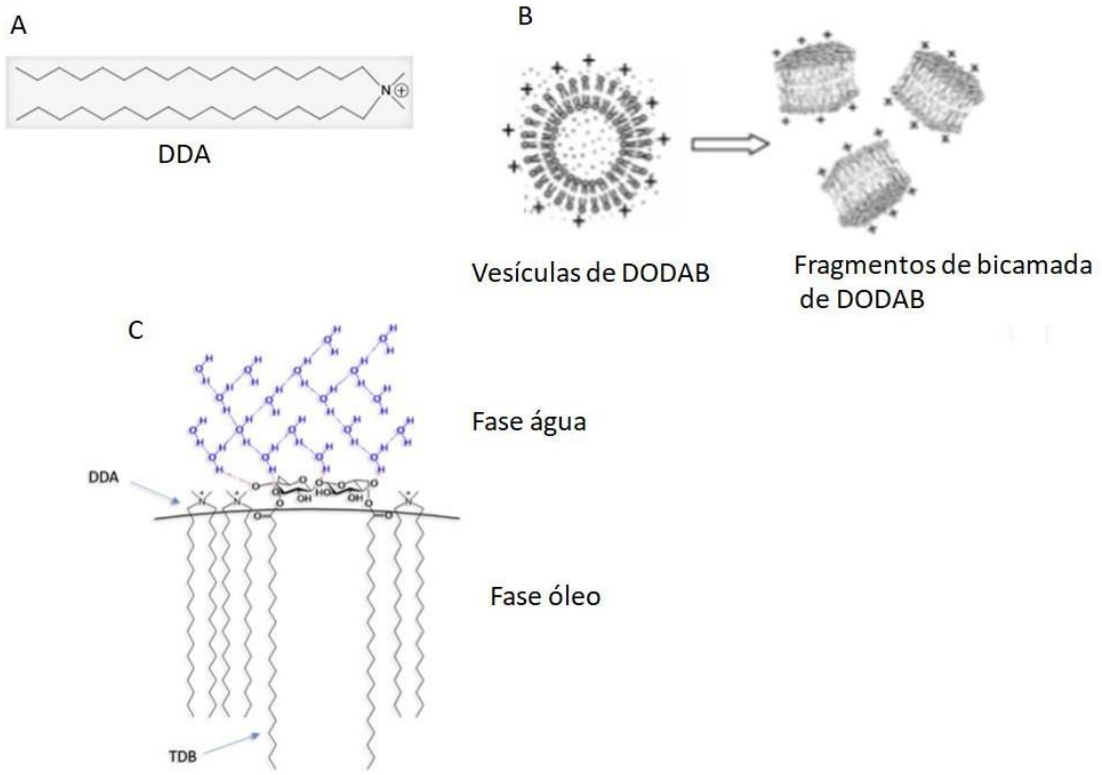
1.6 α,α Trealose 6’6 dibehenato (TDB)

A trealose dibehenato é um análogo sintético da trealose dimicolato (TDM). As cadeias longas e ramificadas da TDM (>60 carbonos) funcionam como importante fator na resposta granulomatosa da micobacteria (CHRISTENSEN et al., 2011; HUNTER et al., 2006a, 2006b; HUNTER;
VENKATAPRASAD; OLSEN, 2006), classificando a TDM como inaceitável no uso clínico. Para a formação da TDB, duas cadeias ramificadas do ácido micólico (TDM) foram substituídas por um ácido graxo saturado de 22 carbonos (behenil) (CHRISTENSEN et al., 2011), que mostrou menor toxicidade *in vivo* enquanto retém a ação adjuvante (HENRIKSEN-LACEY et al., 2011; SAKURAI et al., 1989).

A composição do lipídeo catiônico DDA com a trealose 6’6 dibehenato (TDB) forma o lipossoma catiônico conhecido como CAF01 (*cationic adjuvant formulation*) estudado e produzido pela Statens Serum Institut, Dinamarca. (Figura 3) Embora as propriedades adjuvantes dos lipossomas feitos apenas de DDA tenham sido descritas desde a década de 60 (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965), a adição do imunoestimulador TDB tem aumentando o potencial total dos lipossomas como demonstrado com o CAF01 (DAVIDSEN et al., 2005; HOLTEN-ANDERSEN et al., 2004).

A TDB é um potente adjuvante para vacinação induzindo perfil de resposta imune Th1/Th17, a atividade adjuvante do DDA/TDB (CAF01) é caracterizada por uma robusta resposta com produção de altos níveis das citocinas IFN-γ, IL-17 e baixos níveis de IL-5 (CHRISTENSEN et al., 2011). A TDB é reconhecida pelo receptor Mincle (receptor da família da lectina tipo C), que ativa cascata de sinalização Syk-Card9 nas APCs (CHRISTENSEN, 2017; DESEL et al., 2013; NORDLY et al., 2011; WERNINGHAUS et al., 2009).

Figura 3: Esquema ilustrativo dos lipossomas de DDA, DODAB e DDA/TDB.



(A) Ilustração do DDA (brometo de dioctadecildimetil amônio) representando o átomo de nitrogênio (parte positiva) com 2 grupos metil e 2 grupos dioctadecil (parte negativa) (adaptado de Christensen et al., 2011), (B) vesículas de DODAB (DDA) formadas por auto associação; e fragmentos de bicamada formados por método de sonicação (adaptado de Carmona Ribeiro, 2014). (C) DDA e TDB (trealose dibehenato), o esquema ilustra a interação entre ambos. A água não forma pontes de hidrogênio com o quaternário de amônio, a incorporação da trealose dentro da membrana de DDA possibilita a ligação do hidrogênio entre a superfície do lipossoma e a água promovendo estabilização do lipossoma (adaptado de D. Christensen, 2017).

A resposta imune protetora induzida pelo DDA/TDB em combinação com subunidades proteicas tem sido extensivamente estudada em doenças como tuberculose (AGGER et al., 2008; CHRISTENSEN et al., 2010; LINDENSTROM et al., 2009) clamidia (AGGER et al., 2008; HANSEN et al., 2008; OLSEN et al., 2010; YU et al., 2010) e influenza (BARNIER-QUER et al., 2013; ROSENKRANDS et al., 2011).

A maior parte dos estudos com DDA/TDB foram realizados com o antígeno Ag85B-ESAT6 (H1) de *Mycobacterium tuberculosis*. Os estudos utilizaram camundongos da linhagem C57Bl/6, a rota de imunização foi subcutânea com 3 doses em intervalos quinzenais entre as doses, e re-estimulo das células sanguíneas com o antígeno. Os resultados mostraram altos níveis na produção de IFN-γ, baixos níveis de IL-5, altos

títulos de IgG2b, e baixos títulos de IgG1 que são características da indução de resposta Th1 (DAVIDSEN et al., 2005). Os estudos com DDA//TDB e o candidato vacinal para tuberculose avançaram e estudos sobre segurança, tolerabilidade e imunogenicidade estão em fase I em *trial* clinico (NCT00922363).

1.7 α-galactosil ceramida

A α-GalCer (α-galactosil ceramida) é um glicolipídeo derivado da esponja marinha *Anjelas mauritianos*, que foi originalmente identificado como um componente de atividade antitumoral. Esse glicolipídeo é um potente agonista de células NKT, levando a ativação e expansão dessas células, elicitando a produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias (SULLIVAN; KRONENBERG, 2005) como IL-4, IFN-γ e IL-17 que exercem uma variedade de efeitos subsequentes em outras células do sistema imune (TANIGUCHI et al., 2003).

As células NKT foram reconhecidas como linhagem de células separadas dos linfócitos T convencionais por expressarem, concomitantemente, receptores da linhagem de células NK (BENDELAC et al., 2007) receptor de células T invariante (TCR) codificado pelos segmentos gênicos Vα14 e Jα18 e Vβ8,7,2 em camundongos (BENDELAC et al.,1997; KRONENBER et al., 2002; LANTZ et al, 1994; MATSUDA et al., 2005). Esse TCR invariante é responsável pelo reconhecimento específico de antígenos lipídicos complexados à molécula do tipo MHCI, CD1d (MATSUDA et al., 2005; BENDELAC et al, 2007).

Devido à sua capacidade de potencializar diferentes respostas imunológicas, a α-GalCer foi utilizada como adjuvante em estudos vacinais contra influenza, com base no antígeno M2 (matrix proteica 2) proteína tetramérica transmembrana tipo III altamente conservada. Esse agonista potencializou a produção de IgG2a (induzida por citocinas do tipo Th1), aumentou significantemente a porcentagem de linfoproliferação quando comparada ao antígeno sem a utilização de adjuvante, e levou à produção de altos níveis de citocinas pro e anti inflamatórias, como IFN-γ, IL-12 e IL-4 (FOTOUHI et al., 2017).

2 Justificativa

A utilização de subunidades vacinais, como peptídeos, são fracamente imunogênicas. Esses antígenos necessitam da utilização de um adjuvante que auxilie na indução de resposta inflamatória suficiente, para maturação de células dendríticas e captura efetiva e apresentação do antígeno. O banimento do CFA de estudos em animais e humanos, devido seus efeitos nefrotóxicos e hepatotóxicos, estimularam a busca de adjuvantes que sejam efetivos na entrega e indução de resposta imune protetora desejada.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta imune provocada por diferentes complexos (DDA, CMC e TDB) ao peptídeo sintético P10 em camundongos das linhagens C57BL/6 ($H2^b$) e BALB/c ($H2^d$) , que possuem resistência intermediária a PCM, infectados com Pb18 no modelo experimental de vacinação terapêutica à PCM.

3.2 Objetivos Específicos

1. Padronizar a associação de DDA, CMC e TDB ao peptídeo P10, ajustando concentração, carga superficial e diâmetro médio do complexo.

2. Avaliar perfil de citocinas do homogenato pulmonar dos camundongos infectados com Pb 18 e imunizados com P10 complexado ao DDA, CMC e TDB.

3. Avaliar carga fúngica nos pulmões dos camundongos infectados e tratados com P10.

4. Avaliar as populações envolvidas na resposta imune nos pulmões dos camundongos infectados e tratados (células T $CD4^+$, $CD8^+$, macrófagos e células NK).

4 Material e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados para o estudo camundongos machos C57Bl/6 e BALB/c, ambas linhagens com resistência intermediária a infecção com *P. brasiliensis* (CALICH et al., 1985), com média de idade entre 6 e 8 semanas e com peso entre 25 e 30 gramas. Os animais foram criados em condições SPF (*Specific Pathogen Free*), no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério de animais de experimentação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo. Para cada estudo, foram agrupados 5 a 6 animais, e todos os estudos foram realizados em triplicatas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do ICB/USP (CEUA/USP) registrado sob o nº 101/2014.

4.2 Síntese e Purificação do Peptídeo (P10)

O peptídeo P10 composto por 15 aminoácidos (QTLIAIHTLAIRYAN) (TABORDA et al., 1998) sintetizado e purificado pela Aminotech (São Paulo, SP, Brasil) com grau de pureza superior á 94% (confirmado por espectrometria de massa e HPLC). A solução estoque (1000 µg/mL) foi preparada pela adição de 20% de DMSO (Sulfóxido dimetilo) Sigma (St Louis, MO, USA) e 80% de dispersante desejado, TRIS HCl 1mM Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) ou NaCl 1mM; as alíquotas foram armazenadas em freezer -20º C até a utilização.

4.3 Carboximetilcelulose (CMC)

A carboximetilcelulose aniônica, viscosidade média, Sigma (St Louis, MO, USA), foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas ICBII/USP, e foi preparada em uma concentração de 2mg/mL com solução de D-glucose 0,264mM com pH 6.4. Para o experimento de imunização foi utilizada a concentração de 0,01mg/mL. A CMC foi adicionada ao DODAB BF, e interação da solução ocorreu por 20 minutos, á 25°C (MELO; MAMIZUKA; CARMONA-RIBEIRO, 2010).

4.4 Trealose dibehenato

A D-(+)-trealose 6,6´dibehenato (TDB) pó da Avanti Polar Lipids, foi adquirida da Sigma (Alabama, USA). Estocada a -20º C, de acordo com instruções do fabricante, quantidades desejadas foram pesadas no momento do preparo das vesículas e adicionado ao DDA.

4.5 Lipídeo Catiônico (DODAB)

O lipídeo catiônico DDA utilizado para o estudo foi o brometo de dioctadecildimetil amônio (dioctadecyldimethilammnonium bromide (DODAB)), adquirido pela Sigma Life Science (St Louis, MO, USA), com pureza de 98% (TLC).

4.6 α-galactosil ceramida

O glicolipídeo α-GalCer foi cedido pelo Professor Dr. Alexandre de Castro Keller do Laboratório de Imunopatologia Experimental (LIPE) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP), para o estudo foram administrados 2μg do glicolipídio.

4.7 Preparação dos lipossomas

Os fragmentos de bicamada de DDA (DODAB BF) foram preparadas pela diluição do DDA (2mM) em NaCl 1mM. Após, a diluição, a solução passou por processo de sonicação a 80-90mW, por 20 minutos a 70ºC; em seguida, a solução foi resfriada a temperatura ambiente, por fim centrifugada á 10000g por 1 hora (VIEIRA; CARMONA-RIBEIRO, 2001).

Os lipossomas unilamelares de DDA foram preparados seguindo o método de hidratação de filme (DAVIDSEN et al., 2005; FEITOSA; BARRELEIRO; OLOFSSON, 2000), que consiste na diluição do DDA (5mg) e TDB (1mg) (5:1), em um solução mista clorofórmio/metanol (9:1). O rotaevaporador foi utilizado para remoção do solvente orgânico até a formação de um filme no fundo do frasco. As vesículas unilamelares formadas foram então hidratas com tampão TRIS 10mM (4 mL) resultando

em uma solução de trabalho de concentração de 1,25/0,5mg/mL por 20 minutos a uma temperatura superior à da fase de transição (T_m = 47ºC) até a completa hidratação e armazenada a 4ºC (DAVIDSEN et al., 2005). Para cada estudo, o peptídeo foi adicionado às formulações após o preparo das mesmas, o tempo de interação foi de aproximadamente 1 hora a 25ºC (LINCOPAN et al., 2009a).

4.8 Determinação do tamanho do lipossoma e potencial zeta

O diâmetro médio dos lipossomas, a polidispersão e potencial zeta (ζ) foram determinados utilizando o Zetasizer Nano ZS da Malvern, com laser de He com leitura de 633nm, do Laboratório de desenvolvimento de sistemas de liberação e nanofármacos, do departamento de Farmacologia do ICBI/USP.

Para as leituras, as amostras de fragmentos bicamadas foram diluídas em NaCl 1mM (1:9) (LINCOPAN et al., 2009a) ou água glicosilada a 0,264mM (MELO; MAMIZUKA; CARMONA-RIBEIRO, 2010). Os lipossomas unilamelares foram dispersos em TRIS 1mM pH:7,4 (DAVIDSEN et al., 2005), em uma diluição de 1/300 (Hussain et al., 2014).

4.9 Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento (EE) dos lipossomas e antígeno (Wang et al., 2017) foi estimada pela equação (1).

$$EE(\%) = \frac{antígeno\ total - antígeno\ livre}{antígeno\ total}\ x\ 100\%\ (1)$$

O antígeno livre foi separado dos lipossomas por ultracentrifugação e a quantificação determinada pelo ensaio proteico de Qubit. Invitrogen (Thermo Fisher, Eugene, Oregon, USA). Para a separação, as amostras (lipossomas e peptídeo) foram centrifugadas a 36000 rpm (100.000 x g, ultracentrifuge Beckman Coulter Optima XL-100K, rotor type 70.1Ti) por 1 hora a 4° C, em seguida o sobrenadante contento o antígeno livre foi colhido. A mensuração foi realizada utilizando 20µL das amostras em 180µL de uma solução de trabalho (kit Qubit) incubadas por 15 minutos e realizada a leitura no Qubit Fluorometer Invitrogen. As amostras utilizadas para o ensaio foram:

- Tris 1mM

- P10 (disperso em Tris 1mM)

- DDA/TDB (disperso em Tris 1mM)

- DDA/TDB/P10 (disperso em Tris 1mM)

4.10 Determinação da morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise morfológica dos lipossomas unilamelares de DDA/TDB foi realizada utilizando o microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200EX com filamento LaB6, operando em voltagem de 80kV, do laboratório de microscopia eletrônica da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Para a análise, as amostras dos lipossomas foram diluídas em TRIS 1mM pH:7,4, em seguida, 10µL da amostra foi posicionada no gride de cobre e seca a temperatura ambiente (aproximadamente 2 minutos) em seguida, o excesso foi removido com filtro de papel e adicionado 10µL de Uranila, a amostra permaneceu em temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos, o excesso foi retirado com filtro de papel e levado ao microscópio para leitura (DAVIDSEN et al., 2005).

4.11 Fungo e infecção

O isolado virulento *P. brasiliensis* (Pb18)(SINGER-VERMES et al., 1989), foi utilizado para infectar os camundongos. O isolado foi mantido por passagens semanais em meio sólido Fava Netto á 37º C (NETTO et al., 1969). Para o preparo do inóculo, as leveduras foram cultivadas em meio BHI (Brain Heart Infusion) BD (Maryland, USA) suplementado com 4% de SBF (soro fetal bovino) LCG (Cotia, SP, Brasil), Gentamicina 50.000mg (40µg/mL) Gibco (Grand Island, NY, USA); por 5 a 7 dias. As células fúngicas foram coletadas, lavadas com PBS (Tampão salina fosfato, pH:7,2) passadas através de uma seringa de tubulina (1mL) conectada a agulha hipodérmica para dissociar os agrupamentos celulares existentes e contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade foi determinada por coloração de azul de Trypan (Sigma, St Louis, MO) e foi sempre superior a 90% (MUÑOZ et al., 2014).

Os camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram anestesiados por via intraperitoneal com 300µL de uma solução de Xylazina 2g/100mL, Ketamina 10g/mL em PBS. Depois de anestesiados, os camundongos tiveram sua traqueia exposta, e foram infectados com

50µL de uma solução contendo $3x10^5$ leveduras de Pb18 por animal em PBS estéril. O corte foi suturado e os animais ficaram em repouso até se recuperarem do procedimento.

4.12 Imunização

Os camundongos C57Bl/6 foram imunizados via subcutânea na base da cauda, 30 dias após a infecção. Foram analisados três tipos diferentes de associação: na primeira etapa foi realizado o estudo de diferentes concentrações de DDA e P10; a segunda etapa, diferentes concentrações de DDA/CMC/P10 e então, o estudo de DDA/TDB/P10. Foram realizados três experimentos para cada etapa. Os animais receberam, por experimento, 3 imunizações com intervalos de 2 semanas entre elas. Após 2 semanas da última imunização, os animais foram sacrificados e os pulmões, linfonodos poplíteo e inguinal foram retirados para as análises. Para cada experimento foram utilizados grupo sham (não infectado, não traumatizado pela cirurgia) ou PBS (não infectado) e grupo infectado (sem tratamento) como controle (os grupos experimentais foram descritos em cada sessão do trabalho).

Os experimentos realizados avaliando a imunogenicidade do peptídeo P10 em associaçao ao α-GalCer, foram realizados com a linhagem BALB/c. A infecção dos camundongos foi realizada conforme 4.10. Trinta (30) dias após a infecção, os camundongos foram imunizados via intranasal com uma solução de α-GalCer 2µg associado à sucralose como veículo, ou solução de α-GalCer 2µg/P10 20µg em 20 µL com veículo foi utilizado PBS estéril. Os animais receberam 10 µL de cada solução em cada narina. Os grupos foram divididos de acordo com o experimento realizado: grupo controle PBS, grupo infectado, grupo imunizado com1 dose de α-GalCer, grupo imunizado com peptídeo P10 e grupo imunizado com uma dose de α-GalCer e 3 doses de P10.

4.13 Tratamento antifúngico

O tratamento antifúngico foi realizado trinta dias após a infecção. A droga escolhida foi Bactrin (sulfametoxazol 15mg associada à trimetoprima 3mg/Kg de animal). O sulfametoxazol foi utilizado no tratamento associado ao α-GalCer para avaliar recidiva dos animais após o regime antifúngico. A droga foi diluída em solução fisiológica hospitalar estéril à 0,9%, e foram administrados 300µL via intraperitoneal nos animais por 21 dias consecutivos (MUÑOZ et al., 2014) concomitante ao regime de

imunização escolhido. Os animais foram sacrificados em dois intervalos de tempo: 52 e 2 dias após a infecção.

4.14 Imunosupressão

Os camundongos BALB/c foram submetidos ao regime de imunossupressão para avaliar o efeito do agonista α-GalCer nessas condições. Para a indução da imunossupressão foi utilizada Fosfato de Dexametasona (Sigma, St Louis, MO, USA). O corticóide foi adicionado a água dos animais 20 dias antes da infecção e foi mantida até o dia do sacrifício, 60 dias após a infecção. Assumindo se o peso médio dos animais, e ingestão de água diária de aproximadamente 5mL por animal, a dose de Dexametasona calculado foi 0,15mg/kg animal, o grupo PBS (controle não infectado) não foi imunossuprimido. Os animais imunossuprimidos foram tratados com 1 (uma) dose única de α-GalCer 2µg e α-GalCer 2µg/P10 20µg (1 dose de glicolipídeo e 3 doses de peptídeo em intervalos semanais) por via intranasal.

4.15 Linfoproliferação

Foi realizado o ensaio de linfoproliferação dos linfonodos poplíteos e inguinais, e cervicais dos camundongos infectados com Pb18 e imunizados. Uma alíquota de $3x10^7$ células viáveis em 1mL de meio RPMI1640 LCG (Cotia, SP, Brasil) simples a temperatura ambiente em tubo cônico, foi separada para a marcação com CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) Invitrogen (Thermo Fisher, Eugene, Oregon, USA). As células foram centrifugadas (300g, 10 minutos, 4ºC), descartado o sobrenadante e foram ressuspendidas em PBS com 2% de SFB. Foi adicionado 0,5µL de CFSE 5mM (QUAH; WARREN; PARISH, 2007), ao abrigo da luz, e acondicionado em estufa à 37º C por 10 minutos. Após essa etapa, a reação foi parada adicionando 2mL de soro fetal bovino desativado gelado. E em seguida foi adicionado 4mL de meio RPMI 1640 simples e a suspensão foi mantida em gelo por 5 minutos. As células foram então lavadas duas vezes com meio RPMI simples (300 x g, 10 minutos) e por fim ressuspensas em meio RPMI1640 suplementado.

Depois deste processo, as células foram contadas novamente em câmara de Neubauer com solução de Trypan (diluição 1:10). A concentração celular foi ajustada para $3x10^6$ células em 1mL de meio RPMI1640 suplementado. Desta solução foi

plaqueado 100µL ($3x10^5$ células) por poço. As células do controle positivo estimuladas com mitógeno Concanavalina A (lectina, indutora da ativação de células T) Sigma (St Louis, MO, USA) em uma concentração final de 4µg/mL. Como controle negativo foram utilizadas células não marcadas e, como estímulo foi utilizado P10 em uma concentração final de 20µg/mL (TABORDA et al., 1998). O volume final de cada poço foi de 200µl. A placa foi envolvida em papel alumínio, acondicionada em estufa a 37º C, 5% de CO_2 por 3 (três) dias. Os controles utilizados para o ensaio foram:

- linfócitos em meio RPMI suplementado

- linfócitos marcados com CFSE

- linfócitos estimulados com ConA

- linfócitos marcados CFSE e estimulados com ConA (controle positivo)

- linfócitos marcados com CFSE e estimulados com P10 (20µg/mL)

Após a incubação, as placas foram centrifugadas, 300 g por 10 minutos a 4º C. As células foram marcadas para citometria. Como marcador de viabilidade LIVE/DEAD Pacific blue (Thermo Fisher) ou BD Horizon (San Diego, USA), e a leitura realizada no citômetro LSRFortessa da BD (Becton Dickinson, San Jose, CA) no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do ICB/II.

4.16 Avaliação do tratamento por meio da determinação da carga fúngica

Após sacrifício, os pulmões dos camundongos foram extirpados, e imediatamente pesados. Uma parte dos pulmões teve o tecido rompido em PBS com auxílio de um macerador manual em 2mL de volume de PBS. Desta solução, 100µL foram plaqueados em meio Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com 4% de soro fetal bovino LCG (Cotia, SP, Brasil) e 5% de filtrado de cultura do isolado 192 de *P. brasiliensis* (SINGER-VERMES et al., 1992), 1% de estreptomicina e penicilina Sigma (St Louis, MO). As placas foram mantidas a 37 ° C por um período de 7 a 15 dias. O número de colônias foram contadas e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro (MUÑOZ et al., 2014).

4.17 Isolamento das células pulmonares

Em outra etapa do estudo com DDA/TDB, os pulmões foram retirados e lavados com PBS (1X) estéril, acondicionado em placa de Petri com meio RPMI 1640 (2mL), picados em cortes de aproximadamente 1mm com auxílio de pinças e tesouras estéreis e incubados com 2mL de meio de digestão (2mg Collagenase tipe IV Gibco (Grand Island, NY, USA) e 50 Ui DNase I Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) a 37º C e agitação constante por 1 hora. A reação foi parada com 1mL de SFB inativado gelado. Para que ocorresse a dispersão das células das partes digeridas, a suspensão foi passada através de seringa de 10mL por 10X. Depois desse processo, a suspensão celular foi transferida para tubo cônico de 50mL acoplado com cell strainer (100µm) para remoção dos debris. A suspensão foi re transferida para tubo cônico de 15mL e centrifugada a 300 x g, 5 minutos a 10ºC. O sobrenadante foi retirado, as células homogeneizadas e lisadas com 1mL de tampão de lise (NH_4Cl 0,144M, TRIS base 0,0169M, pH7.4) incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto e em seguida a reação foi parada com PBS 1X suplementado com 10% de SFB inativado, centrifugado a 300 x g por 5 minutos a 10ºC, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB inativado e 10µg/mL de gentamicina, as células foram mantidas em ambiente refrigerado (4ºC) até o processo de marcação de citometria de fluxo (AMARAL et al., 2014).

4.18 Análise histopatológica dos pulmões

Uma fração dos pulmões (lóbulo esquerdo) foi coletada e fixada em formalina (Merck, Alemanha) 10% e enviada para preparação no laboratório de Histologia do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo. Os fragmentos foram embebidos em parafina e cortados na espessura de 4 a 5 µm e corados com hematoxilina-eosina (H.E.) para identificação. As imagens para a análise morfométrica foram adquiridas em microscópio invertido (Zeiss Primovert, Gottingen, Germany) acoplado ao sistema de câmera digital (Axiocam 105 color, Seiss) e processado pelo software ZENcore (Zeiss) no Laboratório de Imunobiologia da interação Leishmania-macrófago do Departamento de Parasitologia do ICBII/USP.

4.19 Quantificação dos níveis de citocinas do homogenato pulmonar pelo método de ELISA

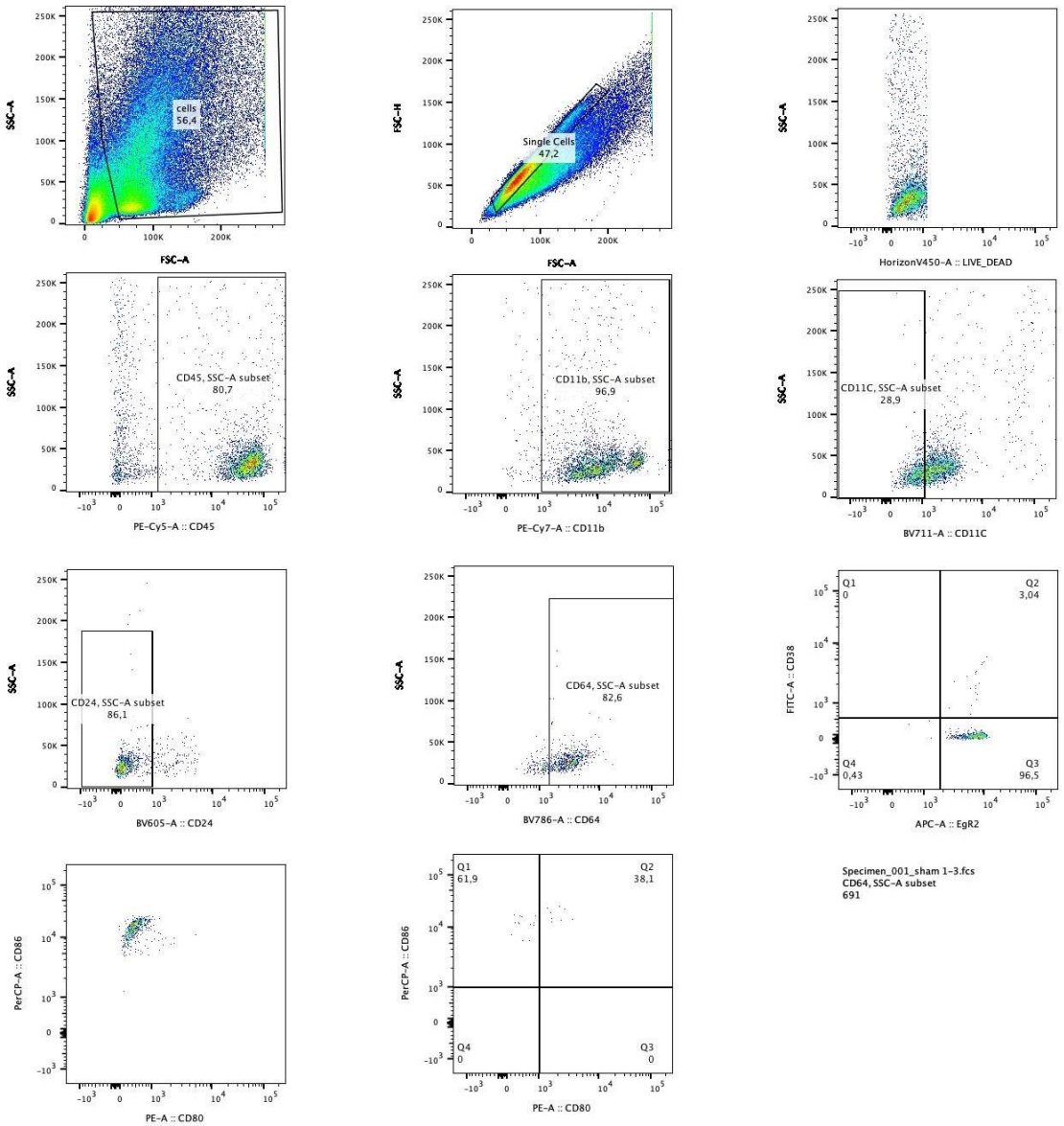
A dosagem dos níveis de citocinas foi realizada quantitativamente pelo método de ELISA (do inglês, *Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay)* de captura seguindo instruções do fabricante BD (Pharmigen, San Diego,CA) para as citocinas IFN-γ, IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, para dosagem da citocina IL-17 foi utilizado o kit ELISA Max, Biolegend (San Diego, CA). As placas foram sensibilizadas com 100 µl dos anticorpos de captura e mantidas a 4 ºC *overnight*. Após este período foram lavadas com PBS-Tween 20 0,05% e bloqueadas com 200 µl de Assay Diluent (PBS-10% Soro Fetal Bovino) por uma hora, a temperatura ambiente. Em seguida, foram novamente lavadas e adicionados aos poços 100 µl das amostras (sobrenadante do homogenato pulmonar) ou das citocinas recombinantes de camundongos (padrão), realizando-se as diluições necessárias e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por duas horas. Após esse período, foram novamente lavadas com PBS – Tween 20 0,05% e adicionados 100 µl do conjugado, composto dos anticorpos de detecção e a enzima. Assim, as placas foram incubadas por uma hora, à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a lavagem da placa e acrescentado 100 µl do substrato da enzima (TMB substrate reagent – BD Pharmingen, San Diego). As placas foram incubadas no escuro, a temperatura ambiente por trinta minutos e a reação foi parada com 30 µl/poço de H_2SO_4 2N. A leitura foi realizada no espectrômetro para microplacas EPOCH 2 da Biotek Instruments (Winooski, VT, USA) equipado com software Gen5 3.03 Biotek, no comprimento de onda de 450 e 570 nm.

4.20 Citometria de fluxo para caracterização das populações celulares

As células obtidas dos pulmões camundongos C57Bl/6 tiveram sua concentração ajustada para $3x10^6$. Foram então centrifugadas a 400 g, 10 minutos à 4 ºC, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* homogeneizado e adicionado 30µL de uma solução de Live/Dead BD Horizon (San Diego, USA) em seguida a placa foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos, adicionado 200µL de tampão FACS, centrifugado e descartado o sobrenadante; o *pellet* foi homogeneizado e foi adicionado Fc block CD16/CD32 BD (San Diego, USA) a placa permaneceu incubada à temperatura ambiente por 30 minutos, em seguida foi adicionado 200µL de tampão FACS, centrifugado e descartado o sobrenadante. Em seguida, o *pellet* foi homogeneizado e adicionado os marcadores de anticorpos desejados a identificação das células, para identificação das APCs foi utilizado

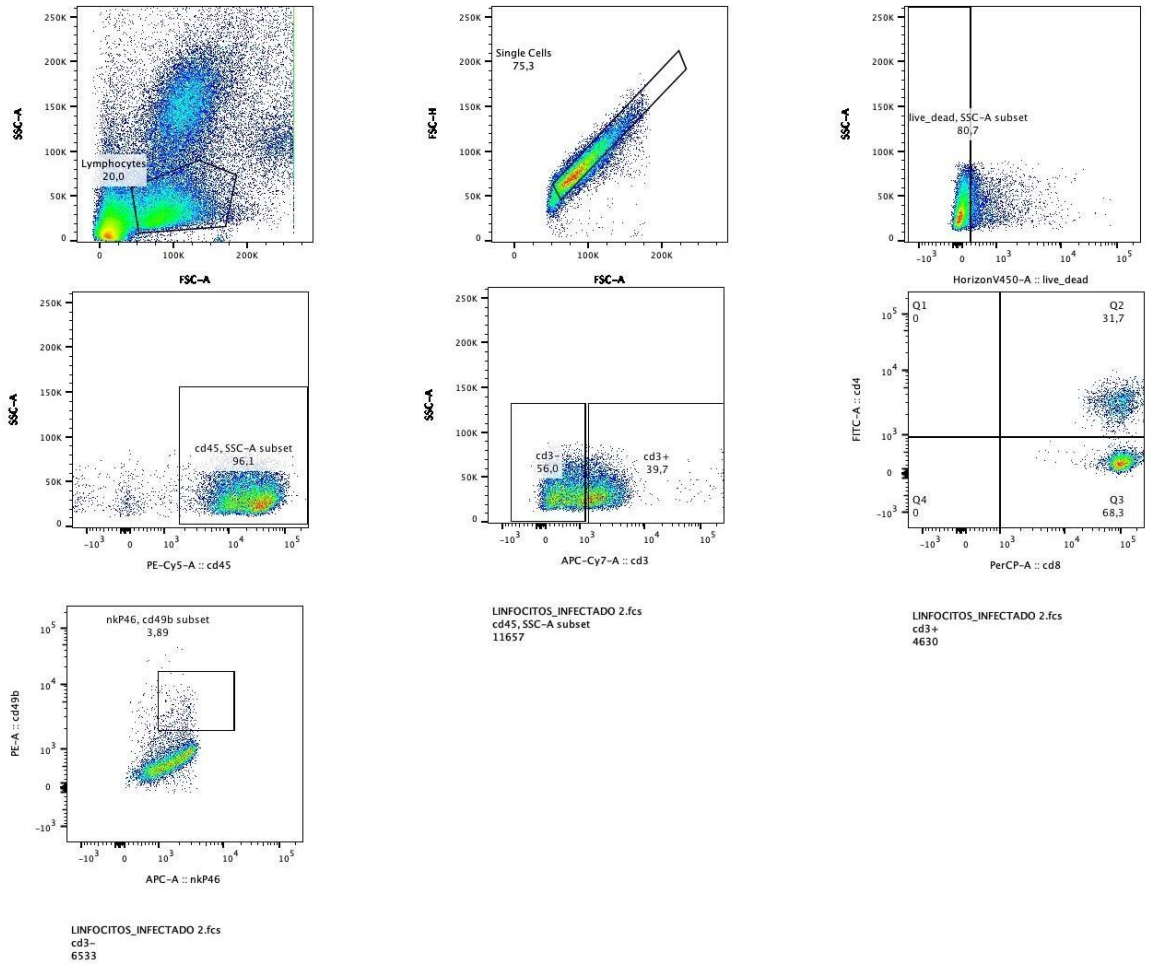
anti-CD45 Pe-Cy5, anti-CD11b Pe-Cy7, anti-CD11c BV711, anti-CD24 BV605, anti-CD64 BV786, anti-CD38 FITC (identificação de macrófagos M1), anti-EgR2 (identificação de macrófagos M2), anti-CD86 PerCP e anti-CD80 Pe (Figura 4). Para identificação de linfócitos foi utilizado o mix de marcadores: anti-CD45 Pe-Cy5, anti-CD3 APC-C7, anti-CD4 FITC, anti-CD8 PerCP, anti-CD49b Pe, anti-NKp46 APC (Figura 5), todos os marcadores utilizados foram adquiridos na BD (Pharmingen, San Diego, USA). As placas foram incubadas à 4º C por 30 minutos protegidas da luz, após esse período foi adicionado 200µL de tampão FACS, as amostras foram então centrifugadas e o sobrenadante descartado. Por fim, foi adicionada às amostras 200µL de solução de PFA 1% (paraformaldeido) homogeneizadas e mantidas em refrigeração (4ºC) até o momento da leitura no citômentro LSRFortessa BD, no Laboratório de desenvolvimento de vacina ICBII/USP.

Figura 4: Fluxograma das estratégias utilizadas para fenotipagem das populações pulmonares.



As populações celulares foram identificadas primeiramente por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), em seguida foram excluídos os doublets (células ligadas) (FSHxFSC), posteriormente a identificação das células vivas utilizando marcador de viabilidade (LIVE/DEAD). Em seguida ocorreu a identificação da população leucocitária (CD45), células positivas para CD11b, negativas para CD11c, negativas para CD24 e positivas para CD64, por fim identificação do fenótipo dos macrófagos M1 (CD38) e M2 (EgR2) e dessas populações, células com moléculas co-estimulatórias ativadas CD80 e CD86.

Figura 5: Fluxograma de estratégias identificação das população de linfócitos.



Os linfócitos foram identificados primeiramente por tamanho (FSC) e granulosidade (SSA), foram excluídos os doblets (FSC x FSH), identificada as populações leucocitárias (CD45) e identificação dos linfócitos utilizando marcador CD3, a população de células $CD4^+$ e $CD8^+$ foram identificadas e por fim as células NK ($CD3^-$).

Para a aquisição foram adquiridos aproximadamente 150000 eventos. Os anticorpos utilizados foram titulados anteriormente em células provenientes do pulmão e foi utilizado uma diluição de 1:100 ou 1:50 dependendo do anticorpo.

4.21 Análises estatísticas

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

5 Resultados

Os resultados deste trabalho foram divididos em 4 capítulos de acordo com o estudo realizado:

- análise do complexo DDA e P10;
- análise da construção supramolecular DDA/CMC/P10
- análise da incorporação da trealose no lipossa de DDA e adsorção do peptídeo P10
- efeito do agonista α-GalCer sobre a imunização com peptídeo P10

6. Capítulo 1 – Análise do complexo DDA/P10

6.1 Propriedades físicas do arranjo DDA/P10

Os lipossomas catiônicos de DDA, rompidos pelo método de sonicação (LINCOPAN et al., 2009b) em solução de NaCl 1mM (BF) (MAYORGA et al., 2012), foram estudados em diferentes concentrações associados ao peptídeo P10, para avaliação da estabilidade do complexo utilizando parâmetros como tamanho (Dz), polidispersão (Pdi) e potencial zeta (ζ). Os resultados obtidos deste método estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Determinação do diâmetro, polidispersão (Pdi) e potencial zeta (ζ) do arranjo formado pelo lipídeo catiônico (DDA) e pelo peptídeo P10, pelo método de sonicação e formação de fragmentos de bicamada (BF) dispersos em solução de NaCl 1mM pH:7,2.

Descrição	**Dz (nm)**	**Pdi**	**ζ (mV)**
DDA 2Mm	67,88±2,1 nm	0,320	+36±1,3
P10 100µg/mL	950,4±4,7 nm	1,00	-4,4±3,4
DDA 0,1mM/P10 10µg	171,4±2,1 nm	0,517	+17,7±1,2
DDA 0,2mM/P10 10µg	128±2,8 nm	0,421	+22±2,1
DDA 0,3mM/P10 10µg	84,61±2,3 nm	0,454	+16,9±2,4
DDA 0,4mM/P10 10µg	83,58±2,1 nm	0,363	+20,3±1,2
DDA 0,5mM/P10 10µg	79,57±2,3 nm	0,390	+16,9±1,7
P10 200µg/mL	901,6±5,7 nm	0,951	+14,9±3,1
DDA 0,1mM/P10 20µg	396,8±2,1 nm	0,789	+20,1±1,2
DDA 0,2mM/P10 20µg	178,9±2,4 nm	0,456	+17,5±1,9
DDA 0,3mM/P10 20µg	128,1±2,3 nm	0,468	+18,8±1,8
DDA 0,4mM/P10 20µg	91,48±1,7 nm	0,479	+18±2,1
DDA 0,5mM/P10 20µg	98±1,3 nm	0,540	+18,8±2,7

Como representado, o lipídeo catiônico à concentração de 2mM apresenta Dz de = 67,88 nm, e é positivamente carregado, com ζ = 36 mV, com baixa Pdi = 0,320. O peptídeo P10 possui pI (ponto isoelétrico) muito alto, cerca de 9,123 (http://isoelectric.org/) conferindo carga positiva à estrutura. Em dispersão de NaCl 1mM, o peptídeo apresentou comportamento neutro com Dz = 950,4 nm, Pdi = 1 e ζ = -4,4 mV à concentração de 100μg/mL. Quando a concentração do peptídeo foi aumentada à 200μg/mL o comportamento do ζ mudou, e a característica do peptídeo tornou se catiônica (+14,9 mV).

A partir dos dados obtidos das partículas de DDA e P10, foram formados os arranjos pela simples interação de ambos [20 minutos, em temperatura ambiente (25°C)] em diferentes concentrações. Os resultados da formação dos arranjos podem ser vistos na tabela 2, onde os arranjos à baixas concentrações de DDA mostraram grande instabilidade conferida pelo Dz e Pdi de altos valores (Dz entre 396,8 a 128 nm, Pdi entre 0,789 a 0,517). Por outro lado, concentrações maiores de DDA mostraram interações melhores entre este e o peptídeo, às concentrações acima de 0,3 mM de DDA formaram complexos cujo Dz possui valores abaixo de 90 nm para concentração de 10μg/mL de P10 e abaixo de 130 nm na concentração 20μg/mL de P10, e Pdi abaixo de 0,5.

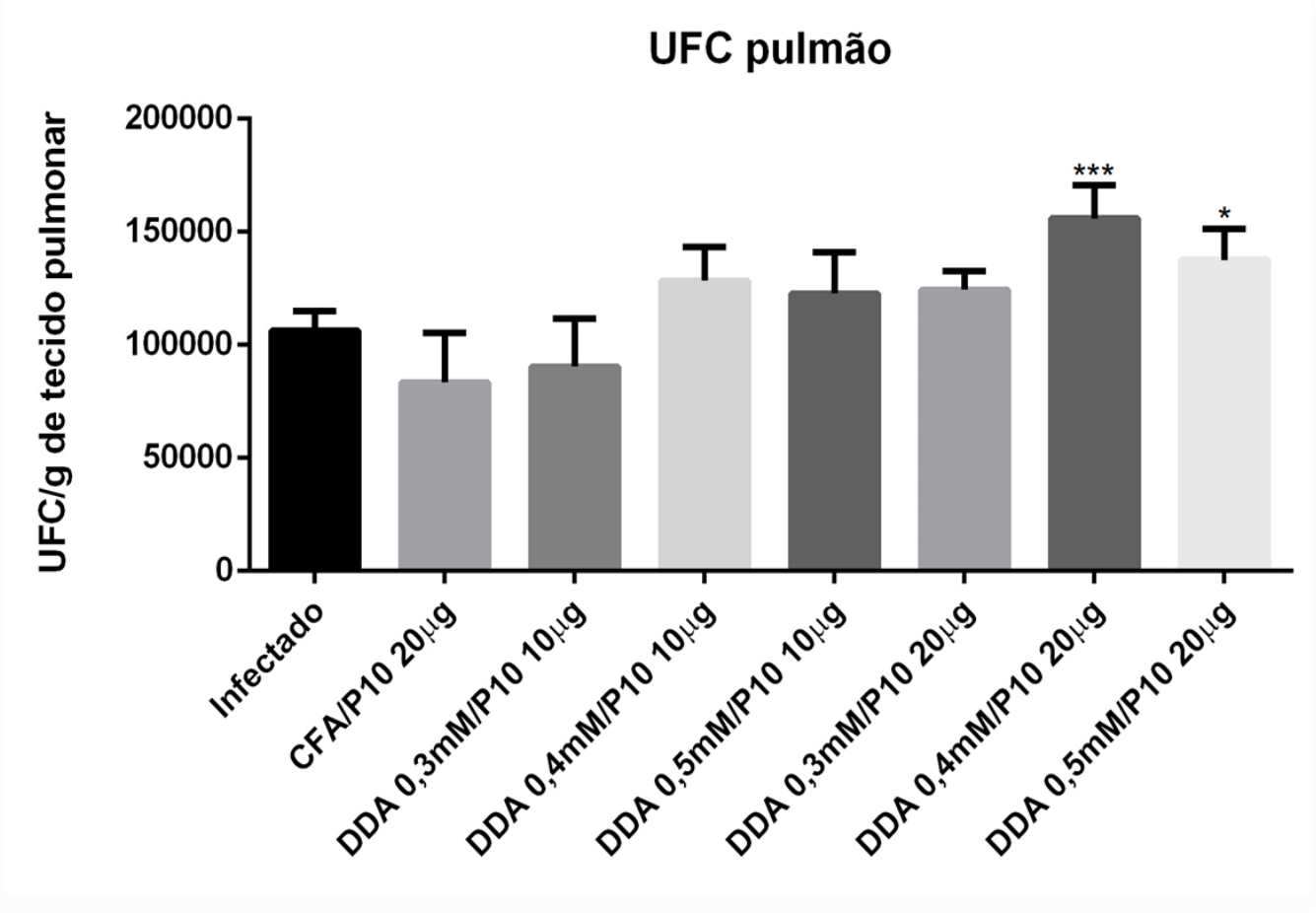
Os arranjos formados pelas concentrações de 0,3 mM, 0,4 mM e 0,5 mM de DDA e peptídeo à concentração de P10 10μg/mL e 20μg/mL foram selecionados por apresentarem maior estabilidade do complexo segundo análise do diâmetro médio, Pdi e ζ. Os grupos utilizados nos estudos foram então:

- grupo sham (não infectado)
- grupo infectado
- grupo imunizado com CFA/P10 20 μg (CFA – Adjuvante completo de Freund)
- grupo imunizado com DDA 0,3mM/P10 10μg
- grupo imunizado com DDA 0,4mM/P10 10μg
- grupo imunizado com DDA 0,5mM/P10 10μg
- grupo imunizado com DDA 0,3mM/P10 20μg
- grupo imunizado com DDA 0,4mM/P10 20μg
- grupo imunizado com DDA 0,5mM/P10 20μg

6.2 Determinação da carga fúngica nos pulmões dos camundongos imunizados com DDA/P10

Trinta dias após a infecção, o tratamento com DDA/P10 foi iniciado (DDA 0,3, 0,4 e 0,5 mM e P10 10 e 20µg/mL), os camundongos C57Bl/6 foram imunizados com 3 doses em intervalos semanais entre elas. Aos 51 dias após a infecção foi realizado o sacrifício e analisado o número de leveduras viáveis dos pulmões dos animais.

Figura 6: Contagem de UFCs dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/P10.



Para determinação da carga fúngica uma parte do homogenato pulmonar foi plaqueado em meio BHI suplementado, e acondicionado em estufa à 37º C por 10 a 15 dias. Como controle positivo foi utilizado um grupo tratado com P10 associado ao CFA (Adjuvante Completo de Freund), os grupos foram formados por diferentes concentrações crescentes de DDA (0,3mM – 0,5mM) e P10 (10 a 20µg) (*=P<0,05 e ***P<0,0001, em relação ao grupo controle infectado).

A figura 6 apresenta o resultado da contagem das UFCs; a imunização feita com

arranjos de DDA/P10 não induziu resposta imune protetora suficiente que levasse à diminuição da carga fúngica nos pulmões dos animais infectados e tratados. O grupo controle imunizado com CFA/P10 apresentou número menor de células viáveis, mas sem significância estatística. O mesmo resultado foi observado no grupo tratado comconcentração DDA 0,3mM/P10 10µg/mL. O aumento nas concentrações do adjuvante e do peptídeo não induziram resposta imune protetora contra a infecção fúngica, ao contrário, parecem ter favorecido o aumento das UFCs em comparação ao grupo controle infectado com significância estatística de 0,05 e 0,0001.

6.3 Quantificação dos níveis de citocinas no homogenato pulmonar

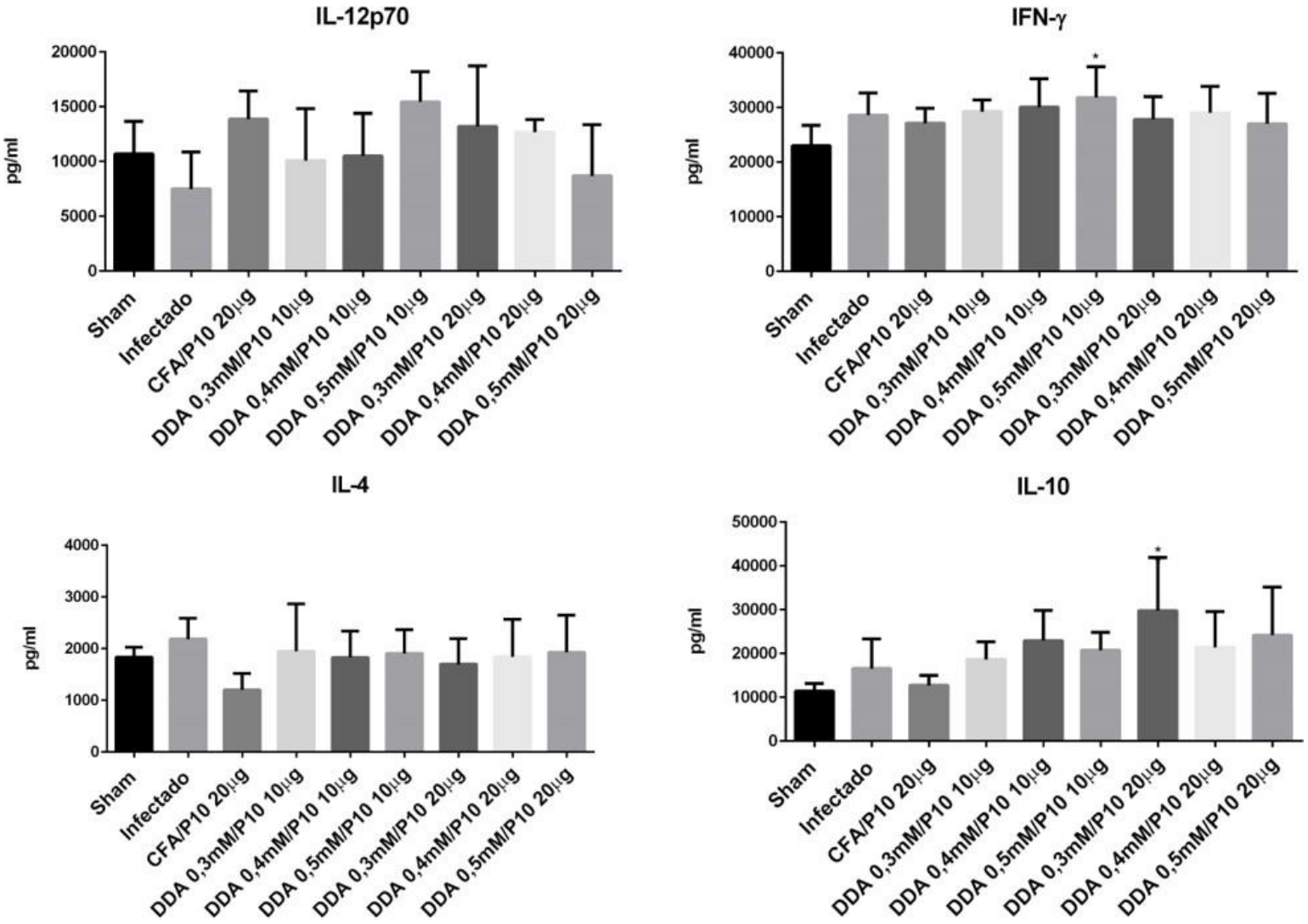
Os níveis de citocinas do homogenato pulmonar foram quantificados pelo método de ELISA. Entre o mileu de citocinas existentes, 4 foram selecionadas para avaliar o direcionamento da resposta imune pelo arranjo DDA/P10: IL-4, IFN-γ, IL-10 ou IL12p70 (figura 7).

Os níveis de citocina IL-12p70, não tiveram diferenças estatísticas entre os grupos tratados O grupo controle infectado e o grupo positivo tratado com CFA apresentaram baixos e altos níveis da citocina respectivamente. Todos os grupos tratados com DDA/P10 tiveram alterações nos níveis da citocina; mas nenhum apresentou diferença estatística quando comparados ao grupo sham.

A imunização realizada com DDA/P10 não alterou os níveis de citocina IL-4 (Th2), no controle positivo (imunizado CFA/P10) os níveis da citocina foram mantidos, e o grupos imunizados com o arranjo DDA/P10 tiveram discreto aumento nos níveis. Porém, não foi detectada diferença estatística. Os níveis de IL-10 também não apresentaram alterações consideráveis; o tratamento administrado com DDA 0,3mM/P10 20µg foi a única concentração de DDA/P10 a apresentar diferença estatística superior as demais concentrações e aos grupos controles.

Os níveis de citocina IFN-γ não sofreram alteração com os tratamentos realizados, o grupo tratado com DDA 0,5mM/P10 20µg, apresentou diferença estatística quando comparado ao outro sham, porém, os níveis da citocina foram similares em todos os grupos inclusive no grupo infectado.

Figura 7: Determinação dos níveis de citocinas do homogenato pulmonar dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/P10.



Quantificação dos níveis das citocinas tipo 1 (IL-12 e IFN-γ) e tipo 2 (IL-4 e IL-10) do homogenato pulmonar dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18 e imunizados com arranjo molecular DDA/P10 em diferentes concentrações do adjuvante (0,03mM – 0,05mM) e peptídeo (10 - 20μg). Os resultados foram expressos em picograma por mL (pg/mL) (*P<0,05).

6.4 Análise histopatológica das lesões pulmonares

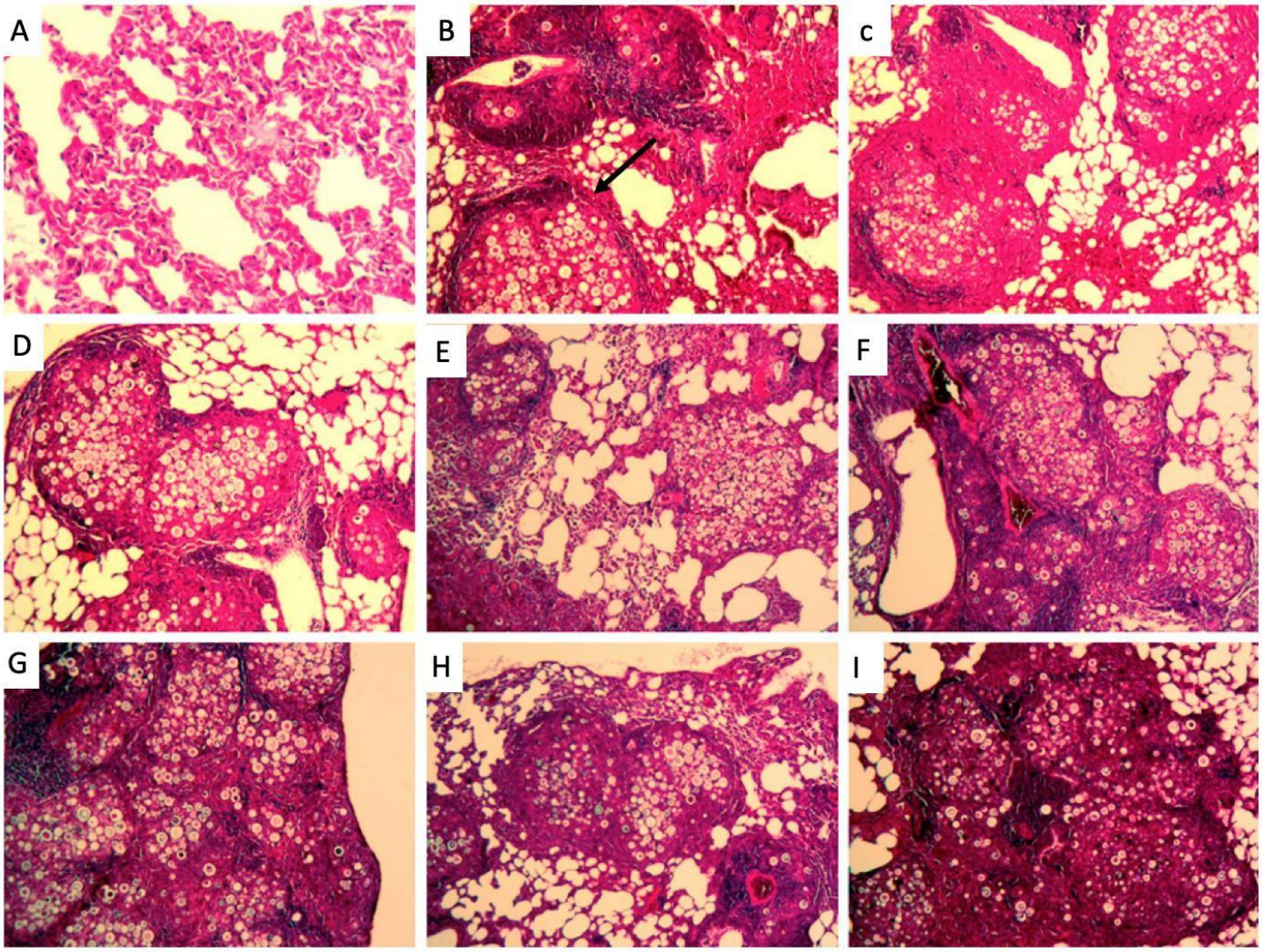
Foi realizada a análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 e avaliado a extensão da infecção e eficiência do tratamento com DDA/P10. Na figura 8 são mostradas as secções dos pulmões corados com Hematoxilina-Eosina (H.E.).

A fotomicrografia observado do grupo sham (A) apresenta preservada estrutura pulmonar, ausência de infiltrado celular e macrófagos. O grupo infectado (B), a fotomicrografia apresenta grande quantidade de infiltrado linfo-histiocitário e mononuclear com grandes áreas de condensação, granulomas bem estruturados com presença maciça de histiócitos epitelióides, presença de leveduras no interior dos granulomas, e dispersas pelo parênquima. O grupo CFA/P10 (C) apresenta granulomas com maior quantidade de histiócitos epitelióides e estruturas mais compactas, com maior preservação da estrutura do parênquima pulmonar e menor quantidade de fungos dispersos.

O grupo imunizado com DDA 0,3mM /P10 10µg (D) apresentou lesões mais extensas, ocupando grande espaço do parênquima pulmonar, granulomas confluentes, presença de infiltrado linfo-histiocitário e mononuclear. Por outro lado, os grupos 0,4mM e 0,5mM (E e F), apresentaram lesões extensas, granulomas frouxos com grande quantidade de leveduras presente, infiltrado linfo-histiocitário e mononuclear denso.

Os grupos 0,3mM e 0,5mM de DDA/P10 20µg (G e I), apresentaram lesões maiores, menor número de granulomas estruturados, presença maciça de infiltrado linfo-histiocitário formando áreas densas, quantidade exuberante de infiltrado mononuclear, pouca preservação da estrutura do parênquima pulmonar e grande quantidade de leveduras presentes fora dos granulomas. Apenas o grupo tratado com DDA 0,4mM /P10 20µg, apresentou lesões mais controladas com maior preservação do parênquima e granulomas mais compactos.

Figura 8: Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/P10



Fotomicrografia das secções dos pulmões esquerdo dos animais embebidos em parafina e corados com Hematoxilina-Eosina (aumento 10x). Na linha superior da esquerda para a direita estão os grupos (A) sham, (B) infectado, (C) CFA/P10, controles para o experimento. Os grupos 0,3mM, 0,4mM e 0,5mM de DDA complexados com P10 10µg (D-F), presentes na linha do meio e por fim, os grupos com concentração de DDA 0,03mM, 0,4mM e 0,5mM complexados com P10 20µg (G-I) na linha inferior. A seta indica a posição do granuloma.

6.5 Linfoproliferação

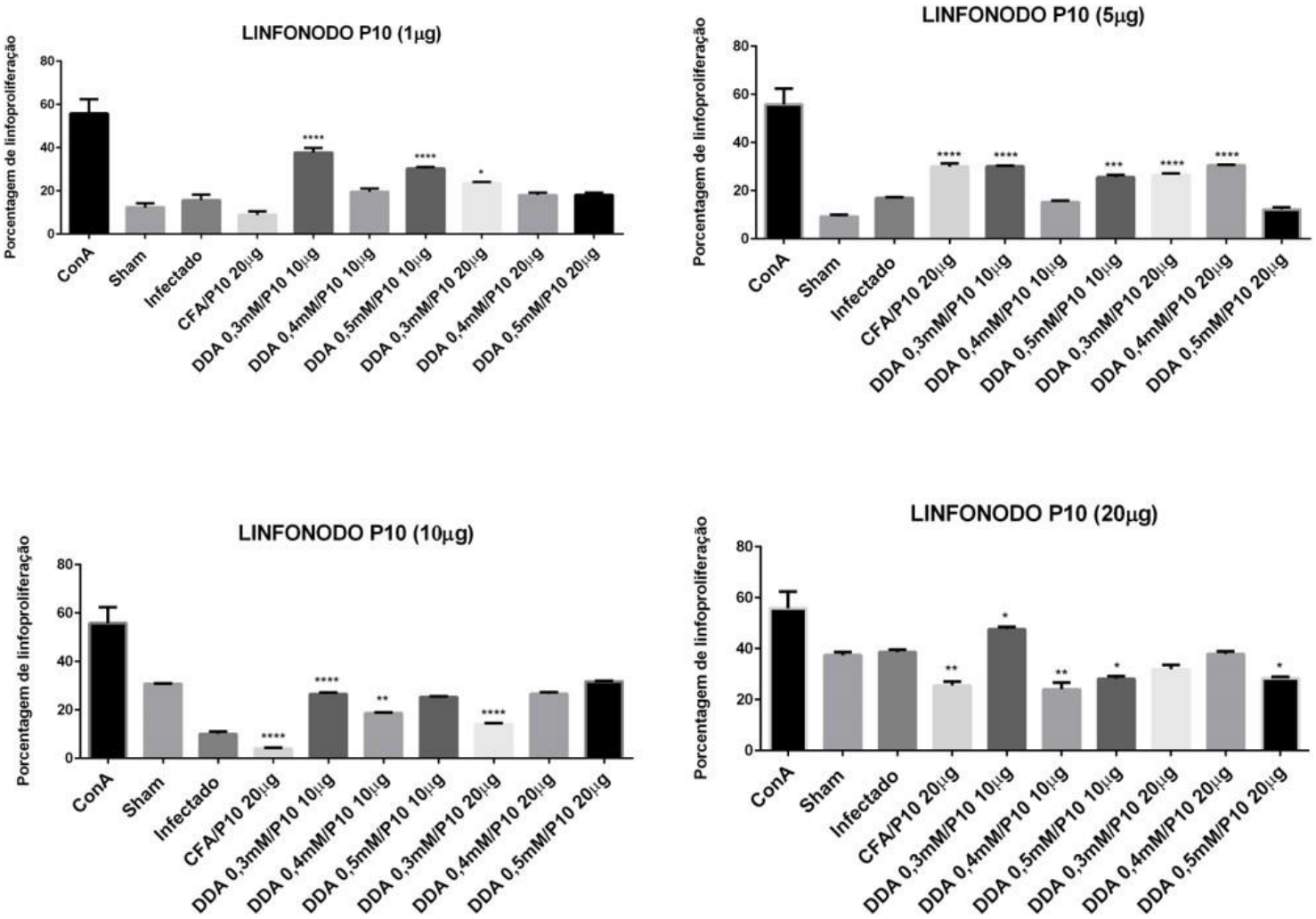
Para o ensaio de linfoproliferação, foram utilizadas diferentes concentrações do peptídeo P10 como re-estímulo, e analisado o efeito dose-dependente sobre os linfócitos; o resultado desse ensaio pode ser visto na figura 9.

O peptídeo teve capacidade de induzir a proliferação dos linfócitos em todas as concentrações utilizadas. O ensaio verificou a habilidade das células em proliferarem frente ao re-estímulo indicando presença de linfócitos T $CD4^+$. As concentrações acima

de 5µg/mL de peptídeo exibiram melhores resultados no ensaio, visto pelo grupo controle positivo CFA/P10 que proliferou em todas elas (5, 10 e 20µg/mL).

Dos grupos tratados com o complexo DDA/P10, apenas o grupo DDA 0,3mM/P10 10µg, teve capacidade de proliferação em todos as concentrações, porém à concentração de 20µg/mL os resultados foram mais expressivos.

Figura 9: Ensaio de linfoproliferação dos linfócitos poplíteos e inguinais dos animais C57Bl/6 imunizados com DDA/P10.



Os linfócitos murinos retirados dos linfonodos poplíteos e inguinais dos animais C57Bl/6 infectados com Pb18 e imunizados (CFA e diferentes concentrações DDA/P10) foram cultivados em meio RPMI suplementado por 72 horas à 37°C, 5% CO_2. Como estímulo foram utilizadas diferentes concentrações de P10 (1 à 20µg/mL) e controle positivo foi utilizado o mitógeno ConA á uma concentração de 4µg/mL (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 e ****P<0,0001).

7. Capítulo 2 – Análise da construção supramolecular DDA/CMC/P10

7.1 Propriedades físicas do arranjo DDA/CMC/P10

Diante da baixa estabilidade e imunogenicidade do complexo DDA/P10, novos estudados foram conduzidos buscando melhorar a estabilidade entre os arranjos e eficácia na captura do peptídeo pelas APCs, tentando alcançar resposta imune protetora desejada. Estudos conduzidos por Melo et al., 2010 levaram à formação de arranjos compostos por DDA, na forma de fragmentos de bicamada (BF), revestido pelo polieletrólito aniônico, carboximetilcelulose (CMC), formando estruturas supramoleculares por auto associação em processo conhecido como Layer-by-layer (LbL) por atração eletrostática entre as camadas de cargas opostas (MELO; MAMIZUKA; CARMONA-RIBEIRO, 2010).

Sabendo se dá característica catiônica do lipídeo e aniônica do polímero, foram construídas estruturas de DDA/CMC e avaliado, a estabilidade do sistema e a ele incorporado o peptídeo P10. Inicialmente, foram selecionadas três concentrações de DDA para avaliar diferenças de carga e tamanho da estrutura em associação com CMC, as concentrações de DDA foram: 0,01mM a 0,05mM, e as concentrações de CMC variaram de 0,01mg a 0,05mg. As leituras realizadas (representadas na tabela 2), mostraram que os fragmentos de bicamada de DDA dispersos em solução isotônica 0,264mM, são positivamente carregados com Dz = 68,4 nm, ζ = 48,6 mV e Pdi 0,232. O polímero aniônico (CMC) disperso na mesma solução à concentração de 0,1mg/mL, apresentou potencial ζ negativo = -41 mV, diâmetro médio Dz = 1276 nm e Pdi = 0,821.

Os fragmentos de bicamada foram então envolvidos pelo polímero e às construções analisadas. Os arranjos apresentaram características aniônicas proporcionada pelo polímero; à 0,01mM de DDA o aumento na concentração de CMC diminuiu a carga superficial do complexo proporcionalmente ao aumento da concentração (-34 mV a -63 mV) às concentrações de 0,03mM e 0,05mM tiveram comportamento inverso, o aumento na concentração de CMC aumentou a carga superficial do complexo (-75 mV a -48 mV, e -80 mV a -68 mV). Já o comportamento do tamanho (Dz) foi parecido em todas as concentrações, aumentando proporcionalmente ao aumento da concentração de DDA e CMC; variando de 81nm a 470 nm à 0,03mM de DDA; 120 nm a 630 nm à 0,04mM de DDA e 130 nm a 670 nm à 0,05mM de DDA. O Pdi aumentou proporcionalmente ao aumento na concentração de CMC variando de 0,34 a 0,75.

Este resultado nos levaram a escolha de três arranjos para a incorporação do peptídeo: DDA 0,01mM/CMC 0,01mg/mL, DDA 0,03mM/CMC 0,03mg/mL e DDA 0,05mM/CMC 0,05mg/mL.

Tabela 2: Diâmetro médio, Pdi e potencial zeta do lipídeo catiônico e polímero aniônico CMC; diferentes concentrações de ambas estruturas foram associadas, o meio de dispersão utilizado foi solução isotônica de D-glicose 0,0264mM, pH=6,4.

Descrição	Dz (nm)	Pdi	ζ(mV)
DDA 2Mm	68,4	0,232	+48,6
CMC 0,1mg/mL	1276	0,821	-41,0
DDA 0,01mM/CMC 0,01mg	81	0,450	-34,6±-2
DDA 0,01mM/CMC 0,02mg	150	0,540	-33,5±6
DDA 0,01mM/CMC 0,03mg	230	0,578	-58,25±8
DDA 0,01mM/CMC 0,04mg	330	0,653	-64,45±4
DDA 0,01mM/CMC 0,05mg	470	0,669	-63,7±1
DDA 0,03mM/CMC 0,01mg	120	0,434	-75,2±8
DDA 0,03mM/CMC 0,02mg	270	0,565	-60,55±5
DDA 0,03mM/CMC 0,03mg	470	0,670	-65,05±2
DDA 0,03mM/CMC 0,04mg	540	0,680	-45,85±1
DDA 0,03mM/CMC 0,05mg	630	0,750	-48,05±3
DDA 0,05mM/CMC 0,01mg	130	0,340	-80,55±3
DDA 0,05mM/CMC 0,02mg	270	0,450	-67,6±4
DDA 0,05mM/CMC 0,03mg	370	0,473	-74,55±1
DDA 0,05mM/CMC 0,04mg	420	0,550	-69,85±3
DDA 0,05mM/CMC 0,05mg	670	0,678	-68,45±2

Os arranjos aniônicos de DDA/CMC foram então envolvidos pelo peptídeo P10 em diferentes concentrações e analisado as características do complexo DDA/CMC/P10. As concentrações de peptídeo utilizadas para a incorporação foram de 1 a 20µg.

A avaliação em concentrações crescentes de molaridade (DDA), massa (CMC e P10) apresentaram caráter catiônico, exibido na tabela 3. É possível observar que o aumento na concentração do peptídeo, proporcionalmente aumenta a carga superficial (potencial ζ), tornando a construção catiônica e mais estável. Essa característica pode ser vista por exemplo nas concentrações de DDA 0,01mM /CMC 0,01mg, onde a associação á 1µg de P10 teve potencial ζ resultante de 16,4mV; quando aumentada à concentração á 5µg o potencial ζ resultante foi de 24,8mV, e o mesmo padrão observado á 10µg (38,8mV)

e 20µg (41,6mV). Essa análise comprova o caráter catiônico do peptídeo em solução isotônica.

O mesmo padrão foi observado em todas às concentrações dos arranjos supramoleculares (0,03mM - 0,05mM de DDA, e 0,03mg - 0,05mg de CMC). As construções de DDA 0,1mM/CMC 0,1mg/P10 20 µg apresentaram carga superficial negativa pois, os fragmentos de bicamada são totalmente envolvidos pelo polieletrólito aniônico, e são necessárias maiores concentrações do peptídeo para compensar as cargas do arranjo DDA/CMC.

Tabela 3: Determinação do potencial ζ dos arranjos supramoleculares de DDA/CMC/ P10; formadas pelo método de sonicação e auto associação, dispersos em solução isotônica de D-glicose 0,0264mM. Foram avaliadas construções formadas em diferentes concentrações das três partículas.

Descrição	Dz (nm)	Pdi	ζ(mV)
DDA 2Mm	68,4±1,2	0,232	48,6±2,3
P10 100µg/mL	789,8±2,7	0,678	36,2±3.4
CMC 0,1mg/mL	1276±3,5	0,821	-41,0±3,9
DDA 0,01mM/CMC 0,01mg/P10 1µg	110±1,7	0,4	16,4±2
DDA 0,01mM/CMC 0,01mg/P10 5µg	103±2,3	0,55	25,5±2
DDA 0,01mM/CMC 0,01mg/P10 10µg	112±1,5	0,49	38,65±2,5
DDA 0,01mM/CMC 0,01mg/P10 20µg	109±0,5	0,51	40,45±1
DDA 0,03mM/CMC 0,03mg/P10 1µg	135±2,4	0,56	17±2
DDA 0,03mM/CMC 0,03mg/P10 5µg	120±3,4	0,54	26,35±3,2
DDA 0,03mM/CMC 0,03mg/P10 10µg	119±3,2	0,46	34,5±2
DDA 0,03mM/CMC 0,03mg/P10 20µg	127±2,1	0,43	32,4±5
DDA 0,05mM/CMC 0,05mg/P10 1µg	156±2,7	0,63	27,8±4
DDA 0,05mM/CMC 0,05mg/P10 5µg	148±2,1	0,56	30,15±2
DDA 0,05mM/CMC 0,05mg/P10 10µg	143±3,3	0,54	30,3±4
DDA 0,05mM/CMC 0,05mg/P10 20µg	136±1,1	0,53	38,8±0,9
DDA 0,1mM/CMC 0,1mg/P10 20µg	880±5,6	0,745	-12±4,5
DDA 0,1mM/CMC 0,1mg/P10 40µg	653±3,9	0,653	+10±4,5

Esses resultados nos conduziram a escolha dos grupos experimentais no modelo de PCM murino, os grupos do estudo foram compostos por:

- grupo sham (não infectado)
- grupo infectado

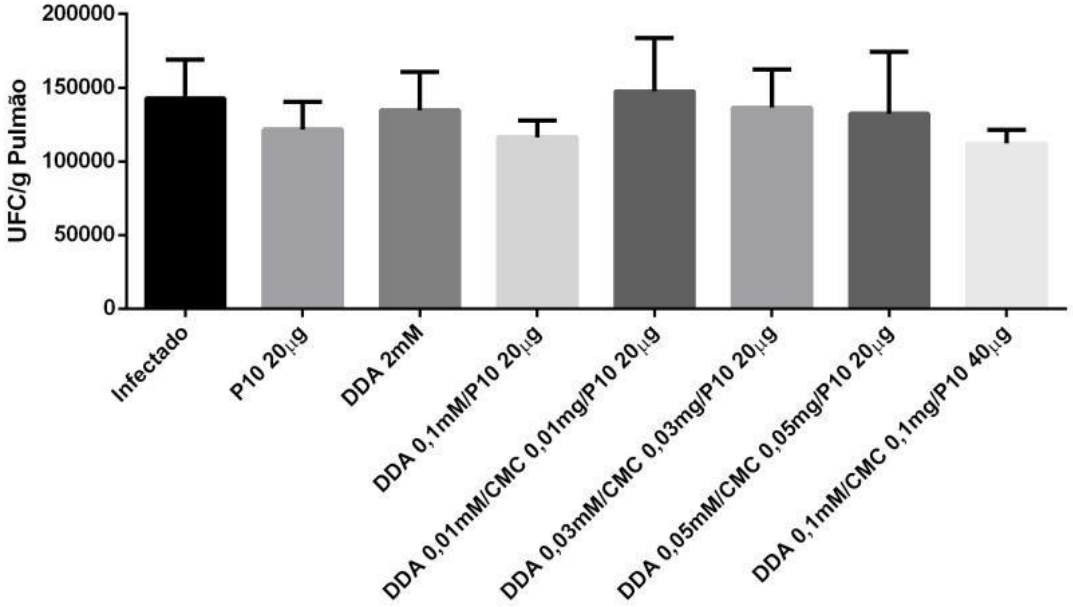
- grupo imunizado com P10 20µg
- grupo imunizado com DDA 2mM
- grupo imunizado com DDA 0,1mM/P10 20µg
- grupo imunizado com DDA 0,01mM/CMC 0,01mg/P10 20µg
- grupo imunizado com DDA 0,03mM/CMC 0,03mg/P10 20µg
- grupo imunizado com DDA 0,05mM/CMC 0,05mg/P10 20µg
- grupo imunizado com DDA 0,1mM/CMC 0,1mg/P10 20µg

7.2 Determinação da carga fúngica

Os arranjos supramoleculares construídos com DDA/CMC/P10, foram administrados em 3 doses de imunização 30 dias após a infecção com intervalos semanais; 1 semana após a última imunização foi realizada o sacrifício dos camundongos C57Bl/6 e uma parte do homogenato foi plaqueado e 10 a 15 dias depois desse processo foi realizada a contagem das células fúngicas viáveis dos pulmões dos animais.

A figura 10 exibe o resultado da contagem de UFCs. Como pode ser observado, os arranjos construídos com DDA/CMC/P10 embora com características mais estáveis, não direcionaram resposta imunológica protetora contra a infecção fúngica por *P. brasiliensis*.

Figura 10: Determinação da carga fúngica dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com construções supramoleculares de DDA/CMC/P10.



O homogenato pulmonar foi plaqueado em meio BHI suplementado e acondicionado em BOD a 37°C por aproximadamente 10 a 15 dias, então foi procedida a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/g). como controle foram utilizados grupo infectado, P10 20µg, DDA 2mM, e DDA 0,1mM/P10 20µg ; os demais grupos foram DDA/CMC/P10 em

diferentes concentrações de DDA e CMC (0,01-0,05mM, e 0,01mg-0,05mg, respectivamente).

Como controle do experimento foram utilizados os grupos imunizados com peptídeo P10 e DDA ambos sozinhos e DDA/P10 em concentrações padronizadas pelo laboratório (DDA 0,1mM/P10 20μg) (MAYORGA et al., 2012). Dos grupos imunizados com as construções de DDA/CMC/P10; o grupo com maior concentração de peptídeo teve discreta diminuição da carga fúngica dos pulmões, mas nenhum deles apresentou diferença estatística ao grupo controle infectado. Esse resultado mostrou que as concentrações utilizadas na imunização com DDA/CMC/P10 podem ter sido insuficientes para indução de resposta imune protetora.

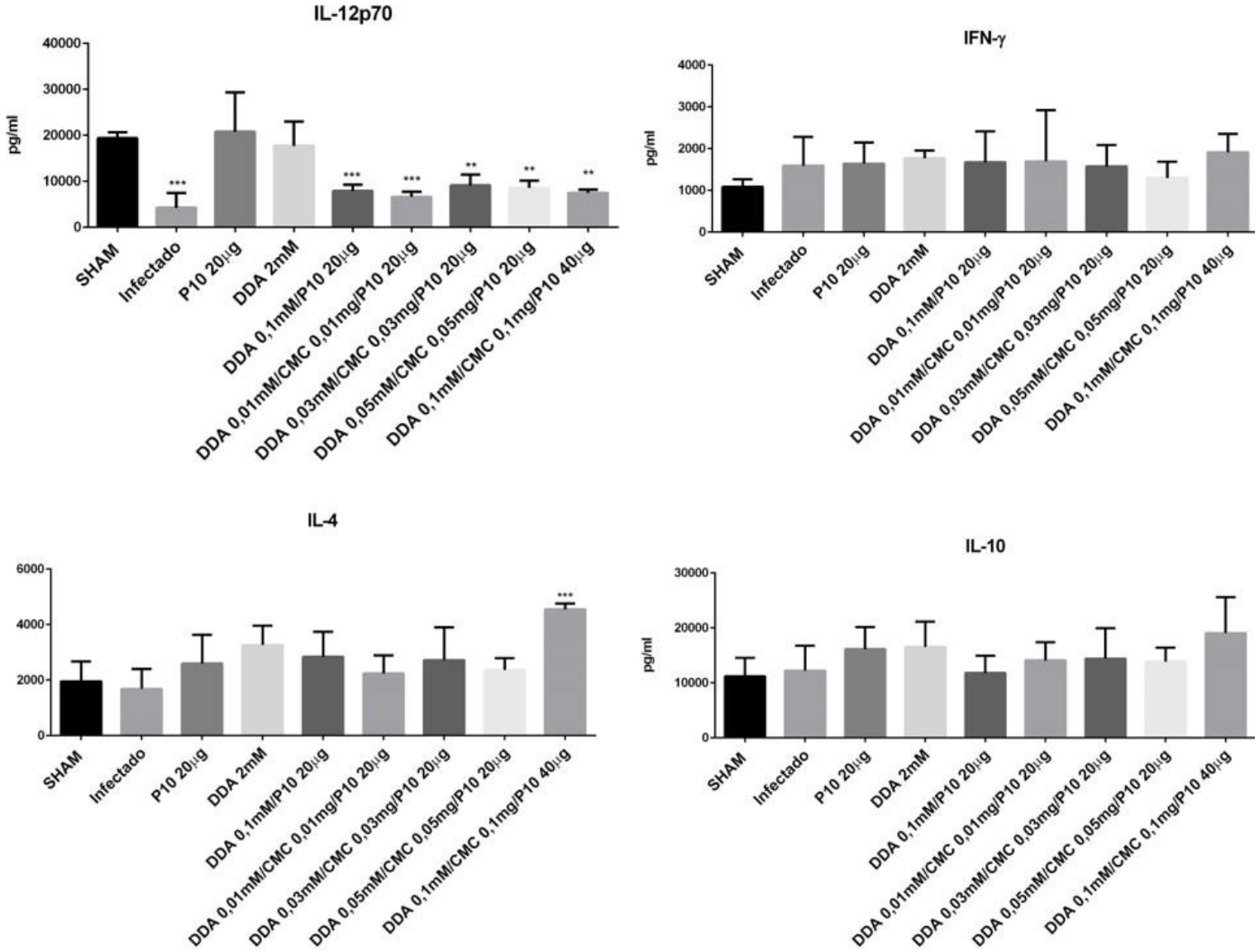
7.3 Determinação dos níveis de citocina pelo método de ELISA

Foi realizada a dosagem dos níveis de citocinas do homogenato pulmonar dos camundongos imunizados com os arranjos supramoleculares de DDA/CMC/P10 para verificar direcionamento da resposta imune. A figura 11 exibe o resultado obtido deste ensaio.

As citocinas de perfil Th1, IFN-γ e IL-12p70, não tiveram alterações significativas em seus níveis em nenhum dos grupos avaliados. A IL-12p70 teve baixos níveis em todos os grupos imunizados com DDA/CMC/P10 semelhantes ao grupo infectado. O mesmo padrão foi observado nos níveis de IFN-γ. A citocina IL-10 não apresentou diferença estatística entre os grupos tratados com o complexo, mas o grupo DDA 0,1mM/CMC 0,1mg/P10 40μg teve aumento nos níveis da citocina, sem significância estatística. A citocina de perfil Th2, IL-4, teve aumento em seus níveis em todos os tratamentos, mas a diferença estatística foi encontrada apenas no DDA 0,1mM/CMC 0,1mg/P10 40μg.

A análise das citocinas mostrou que o grupo com maior concentração de DDA/CMC/P10 teve alteração em seus níveis, levando nos novamente a conclusão que a quantidade dos componentes dos arranjos supramoleculares foi insuficiente para a indução resposta imune protetora.

Figura 11: Determinação dos níveis de citocinas do homogenato pulmonar dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/CMC/P10.



Foi quantificado os níveis de citocinas de resposta imune celular Th1/Th2 do homogenato pulmonar dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18 e imunizados com arranjos supramoleculares de DDA/CMC/P 10 em diferentes concentrações, os grupos controle foram: sham, infectado, P10 20µg, DDA 2mM e DDA 0,1mM/P10 20µg (**P<0,0001).**

7.4 Análise histopatológica das lesões pulmonares

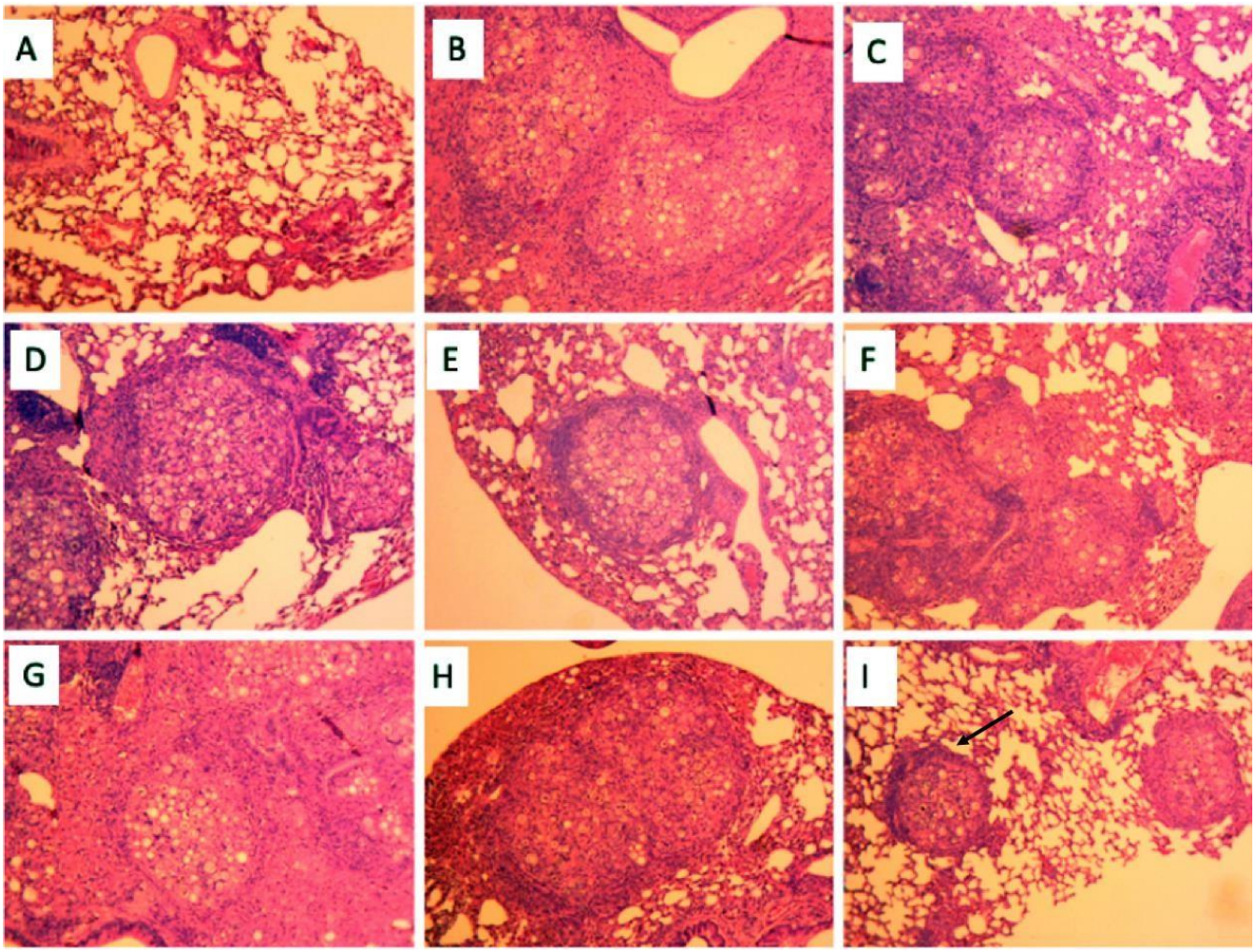
Avaliamos a extensão das lesões pulmonares nos camundongos C57Bl/6 imunizados com diferentes construções de DDA/CMC/P10. A fotomicrografia dos pulmões pode ser vista na figura 12, onde a seção A mostra o corte realizado do grupo sham evidenciado pela preservada estrutura do parênquima, ausência de células linfo-mononucleares: enquanto que a seção B, traz a fotomicrografia do grupo infectado, onde

pode se visualizar leveduras presentes dentro de granulomas formados por grande quantidade de histiócitos epitelióides, presença de infiltrado linfo-histiocitário e mononuclear.

O mesmo padrão se repete nos grupos controles: P10, DDA e DDA/P10 (C – E); com presença maciça de infiltrado linfo-histiocitário e mononuclear, quantidades significativas de histiócitos epitelióides formando um granuloma bem estruturado com numerosas leveduras. Os grupos experimentais de DDA/CMC/P10 em baixas concentrações (F – H) apresentaram características parecidas como: granulomas frouxos, desestruturados e presença de leveduras dispersas pelo parênquima. Por outro lado, o grupo com maiores concentrações das nanoparticulas de DDA/CMC/P10 (I), apresentou característica de maior resposta protetora, com granulomas mais compactos, menor quantidade levedura, menor quantidade de infiltrado linfo-histiocitário e mononuclear e preservação da estrutura do parênquima.

De modo geral, os grupos imunizados com P10 (C), DDA (D) e DDA 0,1mM/P10 20µg (E) e DDA 0,1mM/CMC 0,1mg/P10 40µg apresentaram grânulos mais compactos e estruturas mais preservadas do parênquima.

Figura 12: Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/CMC/P10.

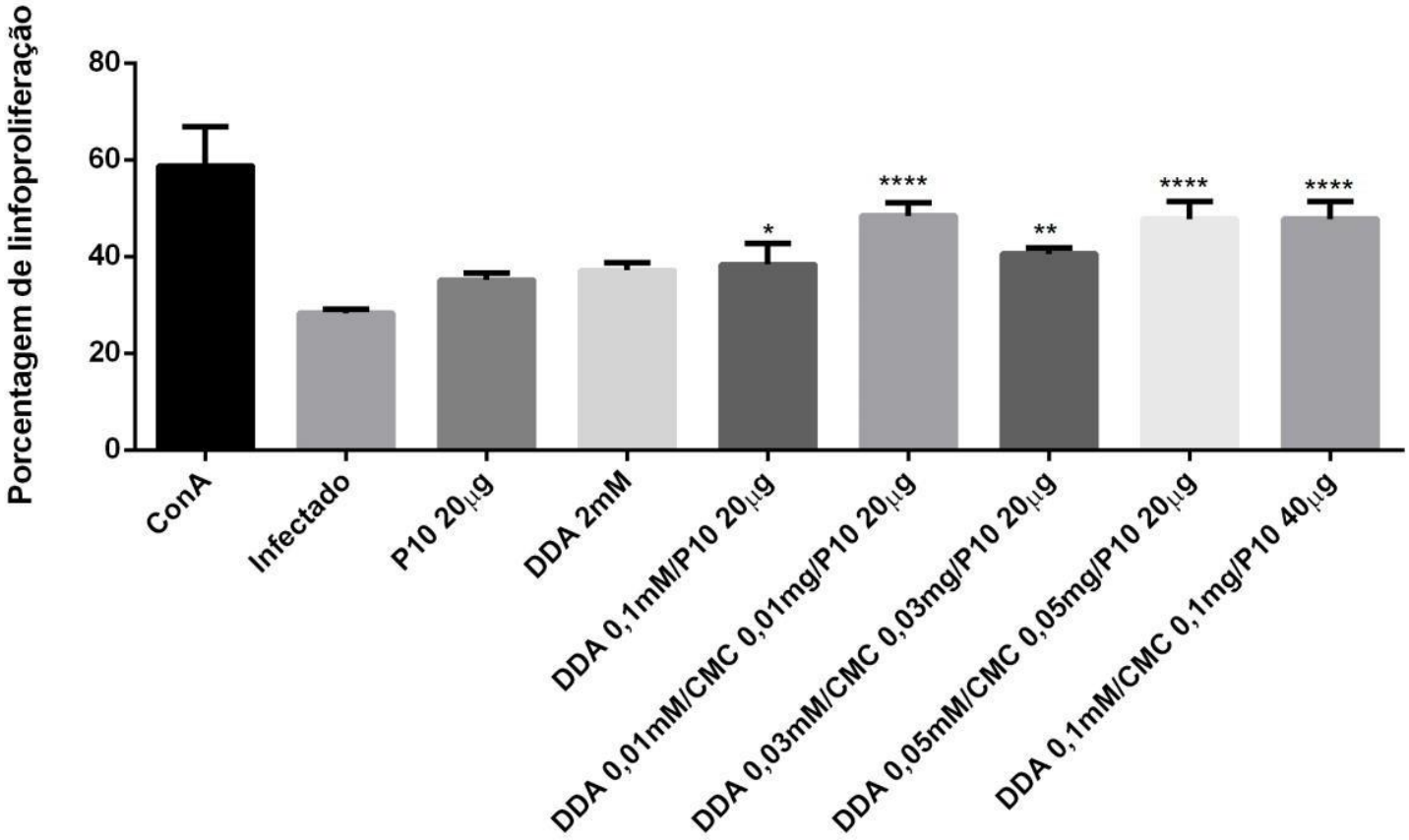


Fotomicrografia das secções do lóbulo esquerdo dos pulmões dos camundongos infectados e imunizados com construções supramoleculares de DDA/CMC/P10. Os grupos controles: sham (A), infectado (B), P10 20µg(C), DDA 2mM (D) e DDA 0,1mM/P10 20µg(E); e os grupos experimentais: DDA 0,01mM/CMC 0,01mg/P10 20µg (F), DDA 0,03mM/CMC 0,03mg/P10 20µg (G), DDA 0,05mM/CMC 0,05mg/P10 20µg (H) e DDA 0,1mM/CMC 0,1mg/P10 40µg (I), a seta indica a estrutura do granuloma.

7.5 Ensaio de linfoproliferação

Foi realizado o ensaio de linfoproliferação sobre os linfócitos dos linfonodos inguinais e poplíteos dos camundongos C57Bl/6 re-estimulados com peptídeo P10 (20µg/mL.).

Figura 13: Linfoproliferação dos linfócitos dos linfonodos poplíteos e inguinais dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/CMC/P10.



Os linfócitos murinos retirados dos linfonodos poplíteos e inguinais dos animais C57Bl/6 infectados com Pb18 e imunizados diferentes concentrações DDA/CMC/P10 cultivados em meio RPMI suplementado por 72 horas à 37° C, 5% CO2. Como controle foi utilizado ConA a uma concentração de 4mg/mL e estímulo P10 20µg/mL (*P<0,05, **P<0,01, e ****P<0,0001).

Como representado na figura 13, todos os grupos imunizados com construções de DDA/CMC/P10 apresentaram capacidade expansão em resposta ao re-estímulo com P10 à 20µg/mL, inclusive com diferença estatística quando comparado ao grupo controle

infectado.

8. Capítulo 3 – Análise da incorporação da trealose no lipossoma de DDA e adsorção do P10

8.1 Incorporação da Trealose dibehenato ao DDA e P10

Visto que as construções utilizadas com DDA/CMC/P10 também não tiveram imunogenicidade suficiente na indução da resposta imune protetora contra a infecção por Pb18; outros estudos avaliando o papel imunomodulador do peptídeo P10 e do adjuvante DDA foram realizados.

A literatura apresenta uma construção lipossomal catiônica feita com DDA associado à trealose dibehenato (TDB) chamada CAF01 (complex adjuvant formulation), a TDB possui característica imunopotencializadora da resposta imune direcionada Th1/Th17. O DDA/TDB foi utilizado nos estudos vacinais contra infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, esses estudos mostraram que a utilização do adjuvante levou a uma robusta resposta imune celular Th1/Th17. Seguindo os dados da literatura, foi estudada as características da construção do DDA/TDB (CAF01) e a este incorporado o peptídeo P10.

Tabela 4: Preparo das vesículas lipossomais pelo método de hidratação com TRIS 10mM, foi utilizado como meio de dispersante tampão Tris 1mM, pH 7,4. Valores obtidos da medição do diâmetro médio (Dz), polidispersão (Pdi) e potencial ζ.

Descrição	Dz (nm)	Pdi	ζ (mV)
DDA /TDB 250/50µg	471,5±2	0,528	44,3±2
DDA/TDB 250/50µg/P10 20µg	667,9±3	0,302	39±3
DDA/TDB 312,5/62,5µg/P10 20µg	650,8±5	0,369	44,7±3
DDA/TDB 100/500µg/P10 20µg	639,2±3	0,411	45,7±4

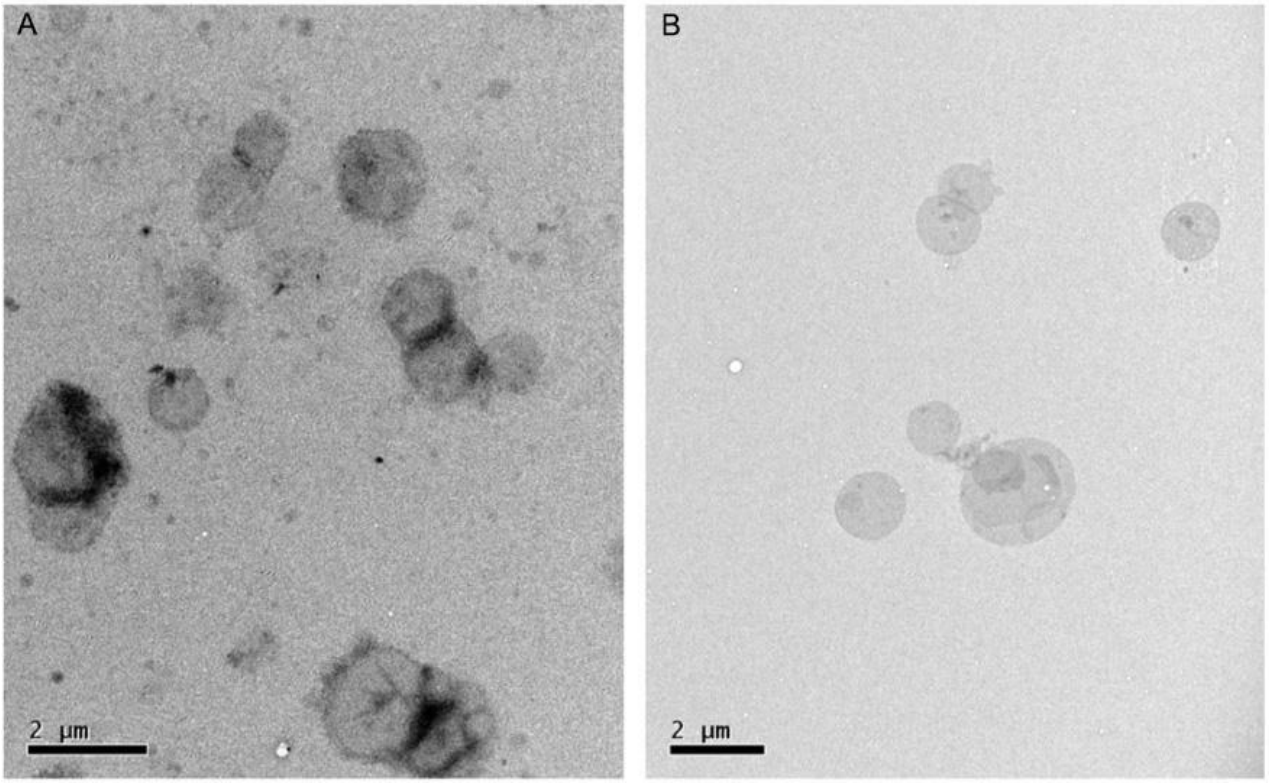
A construção do lipossoma DDA/TDB foi realizada pelo método de hidratação (DAVIDSEN et al., 2005), a tabela 4 traz as características físico-química dessas construções. As vesículas de DDA/TDB preparadas por esse método e dispersas em tampão Tris 1mM apresentam diâmetro médio de 471,4 nm, a estabilidade da suspensão foi alcançada pela carga positiva das vesículas (44,3 mV); a polidispersão (0,528) dos lipossomas é considerada média e dentro dos parâmetros, visto que os lipossomas formam vesículas de tamanhos diferentes constituindo populações variados (heterodispersão).

A incorporação do peptídeo P10 ao lipossoma foi realizada pela simples adição do peptídeo a solução de DDA/TDB, e repouso da associação à temperatura ambiente (25° C) por 20 minutos. A incorporação do peptídeo modificou o diâmetro médio do lipossoma (tabela 4), aumentando a 667,9 nm e diminuiu a Pdi para 0,302, enquanto que

o potencial ζ das vesículas praticamente não foi alterado. É interessante destacar, o aumento na concentração de DDA e TDB na construção dos lipossomas, não alterou significativamente o Dz das mesmas, tão pouco modificou seu Pdi e potencial ζ.

Outro parâmetro avaliado nos lipossomas compostos de DDA/TDB foram as características morfológicas das vesículas. Para isso, foi realizado a leitura por microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos lipossomas sozinhos e com peptídeo a eles incorporado, verificarificando possíveis mudanças na conformação estrutural das mesmas. Como visualizado na figura 14, a micrografia (MET) revelou que a morfologia das vesículas construídas com DDA/TDB possuem forma esférica, levemente angular, com poucos sinais de agregação e com populações de tamanho diverso. As vesículas com peptídeo incorporado (DDA/TDB/P10) mostraram se esféricas, mais estruturadas com bordas bem delimitadas, com poucos sinais de agregação e maior uniformidade no tamanho.

Figura 14: MET das vesículas lipossômicas de DDA/TDB e DDA/TDB/P10.



Lipossomas de DDA/TDB preparados pelo método de hidratação com tampão Tris 10 mM. As vesículas preparadas somente com DDA/TDB (a) são esféricas e tem maior diversidade no tamanho, a incorporação do P10 (b) as vesículas não demonstraram mudanças significativas no tamanho das vesículas. Para a análise as amostras foram diluídas 10x.

8.2 Quantificação de adsorção do peptídeo ao lipossoma

Foi quantificado a porcentagem de peptídeo incorporado ao lipossoma (eficiência de encapsulamento). Para isso os lipossomas foram centrifugados e o sobrenadante reservado e dosado por Qubit; o resultado pode ser visto na tabela 5.

Tabela 5: Eficiência de encapsulamento do peptídeo P10 ao lipossoma de DDA/TDB mensurada pelo método Qubit.

Descrição	Concentração proteína inicial	Concentração proteica final	Eficiência de encapsulamento
DDA/TDB 250/50µg/P10 20µg	4800µg/mL	316µg/mL	93%

A incorporação do peptídeo no lipossoma construído com DDA/TDB teve sucesso de 93% mostrando que o peptídeo foi eficientemente adsorvido pelas vesículas.

Diante da avaliação das características físico-químicas dos lipossomas com peptídeo incorporado, foi realizado o experimento em modelo de PCM experimental murino em C57Bl/6, os grupos experimentais foram compostos por:

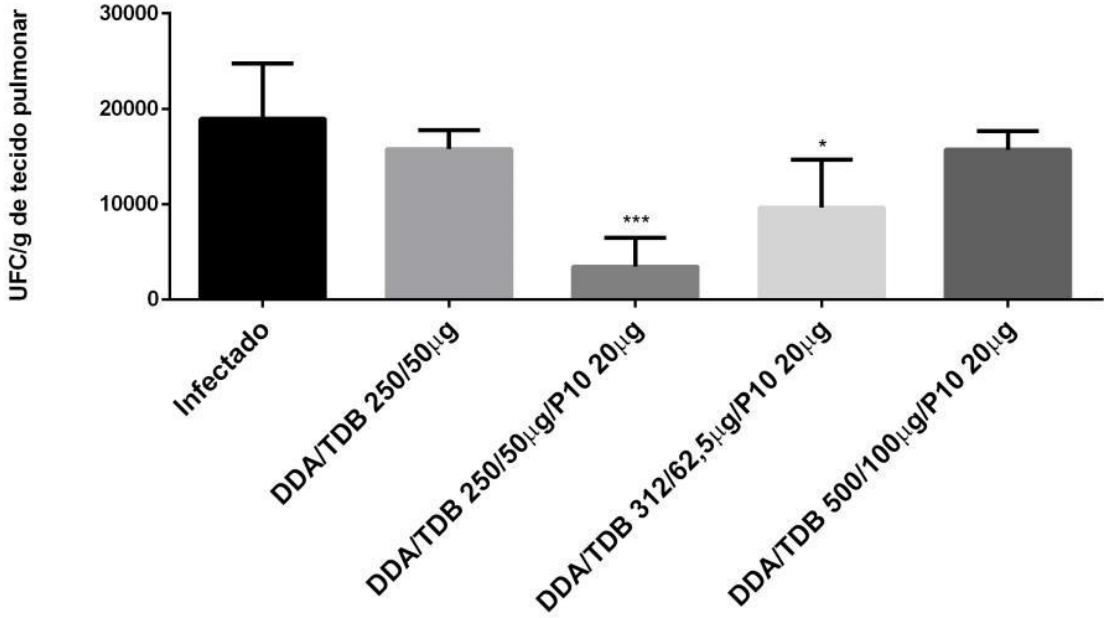
- grupo sham (não infectado)
- grupo infectado
- grupo imunizado com DDA 250µg/TDB 50µg
- grupo imunizado com DDA 250µg/TDB 50µg/P10 20µg
- grupo imunizado com DDA 312µg/TDB 62,5µg/P10 20µg
- grupo imunizado com DDA 500µg/TDB 100µg/P10 20µg

8.3 Determinação da carga fúngica nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18 e imunizados com DDA/TDB/P10

Para avaliar o efeito imunogênico do complexo DDA/TDB/P10 os camundongos C57Bl/6 foram infectados com P18 e 30 dias após a infecção foram imunizados com três doses, com intervalo de 15 dias entre cada dose, o sacrifício ocorreu 15 dias após a última imunização. Após o sacrifício, os pulmões foram excisados e uma parcela do homogenato foi plaqueado para contagem das UFCs.

Para avaliar a eficiência no tratamento três concentrações de DDA/TDB foram escolhidas: 250/50 µg, 312/62,5 µg e 500/100 µg baseado no estudo realizado com antígeno H1 (vacina para tuberculose) (VAN DISSEL et al., 2014). O resultado obtido da contagem de células fúngicas viáveis do homogenato pulmonar pode ser visto na figura 15.

Figura 15: Contagem de UFC dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados de DDA/TDB/P10.



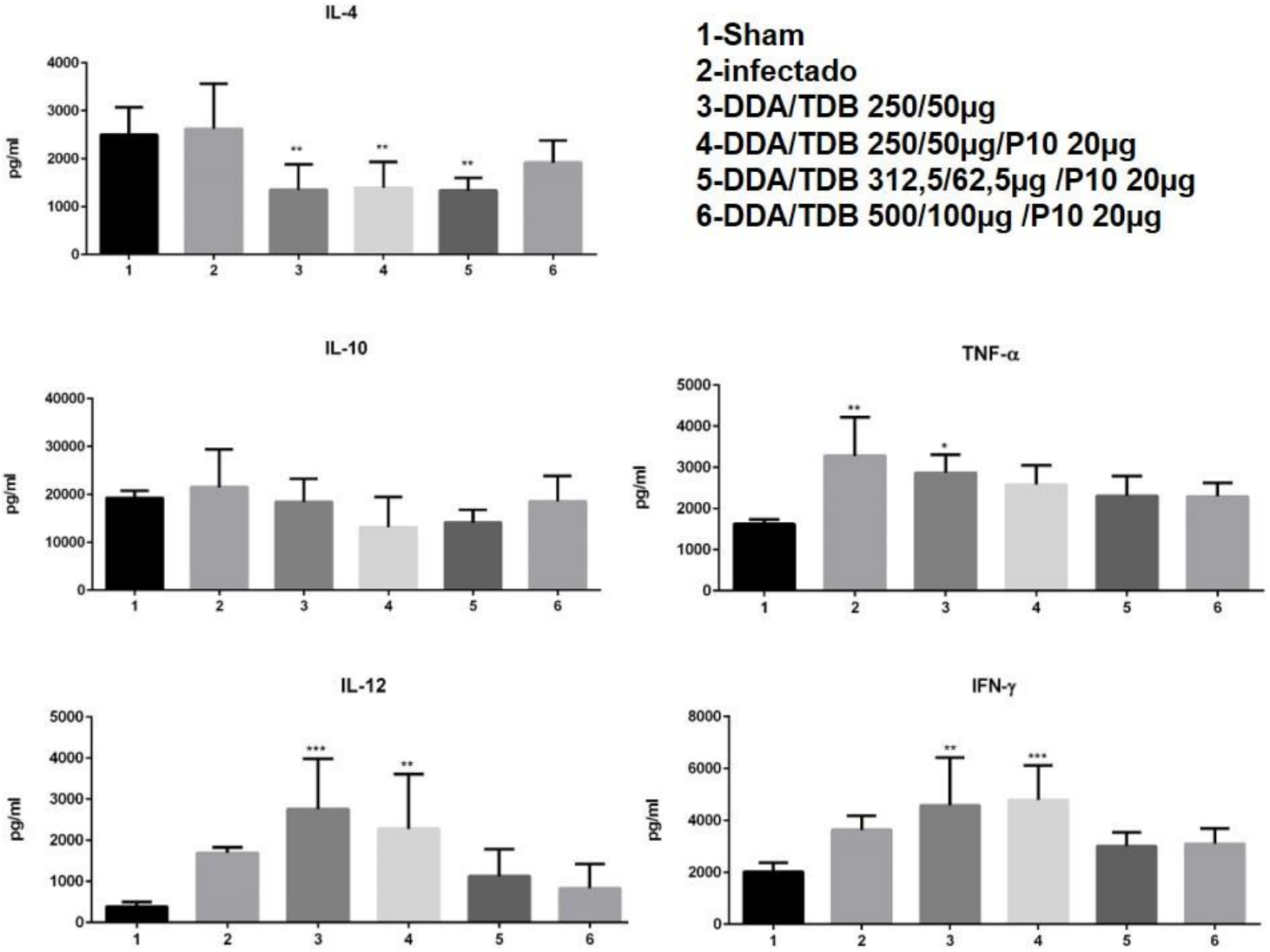
O homogenato pulmonar foi plaqueado em meio RPMI 1640 suplementado, as placas foram incubadas a 37º C por 10 a 15 dias. Como controle do experimento foram utilizados os grupos infectado e DDA/TDB sem peptídeo; os grupos experimentais foram compostos por crescentes concentrações de DDA/TDB 250 a 500µg, 50 a 100µg, respectivamente. (P*<0,05 e P*<0,001).**

A imunização dos animais C57Bl/6 com o complexo adjuvante catiônico DDA/TDB e peptídeo P10 incorporado, foi efetiva na indução de resposta imune protetora, conferida pela diminuição da carga fúngica nos pulmões dos camundongos. Os grupos imunizados com às concentrações de 250/50µg e 312,5/62,5µg de DDA/TDB mostram diminuição das células viáveis estatisticamente significante com valores de 0,05 e 0,001 respectivamente. Os outros grupos DDA/TDB sem peptídeo, e com concentração de 500/100 µg, mostraram discreta tendência a diminuição, mas sem diferença estatística quando comparados ao grupo controle infectado.

8.4 Quantificação dos níveis de citocinas no macerado pulmonar pelo método ELISA

Foram quantificados os níveis das citocinas presente no homogenato pulmonar, dos camundongos C57Bl/6. Estudos com DDA/TDB mostraram que o adjuvante induz a uma resposta imune protetora composta por citocinas do tipo Th1/Th17.

Figura 16: Determinação dos níveis de citocinas do homogenato pulmonar dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10.



As principais citocinas de resposta imune celular Th1 e Th2 foram quantificadas no homogenato pulmonar dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18 e imunizados com P10 na presença do adjuvante DDA/TDB. Como controle foram utilizados os grupos sham, infectado e DDA/TDB sem peptídeo, os níveis de IL-10, IL-4, IL-12 e IFN-γ foram expressos em pg/mL. (P*<0,05, P<0,001, P***<0,0001)**

A figura 16 traz o resultado da quantificação das citocinas pelo método de ELISA,

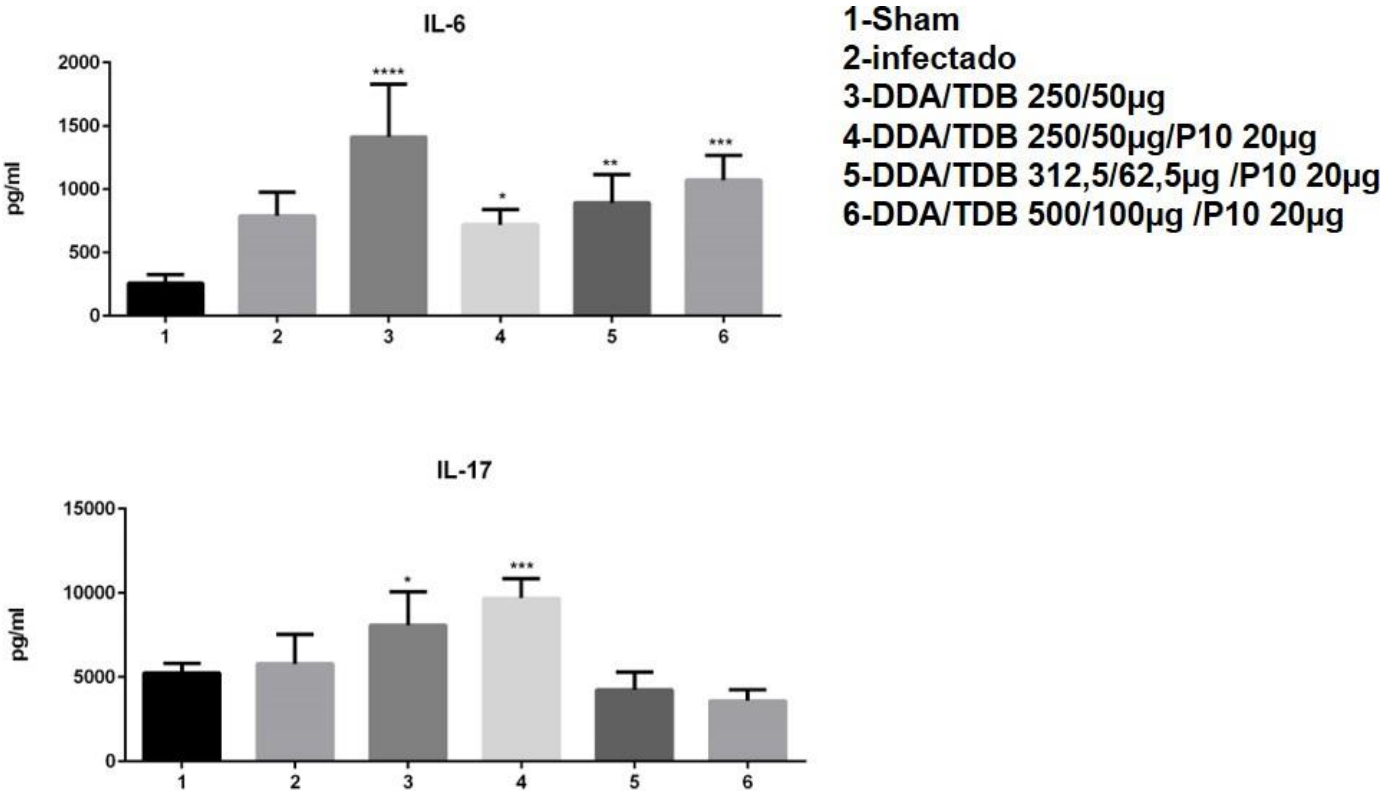
pode se visualizar nela que os níveis da citocina IL-10 não apresentou alteração em nenhum dos grupos estudados.

A citocina anti-inflamatória IL-4 teve seus níveis menores nos grupos tratados com DDA/TDB e DDA/TDB/P10, exceto no grupo DDA/TDB 500/100µg/P10, indicando baixa indução da resposta Th2. Por outro lado, a citocina IL-12p70 teve altos níveis apenas nos grupos DDA/TDB 250/50µg e DDA/TDB 250/50µg/P10 20µg.

Foram verificados altos níveis de IFN-γ nos grupos DDA/TDB sozinho e DDA/TDB 250/50µg/P10 20µg. Os grupos tratados com P10 e concentrações maiores de DDA e TDB (312,5/62,5µg e 500/100µg) não induziram a produção de IFN-γ, ao contrário, a análise mostrou que esses grupos tiveram menos produções nos níveis desta citocina.A citocina TNF-α apresentou altos níveis no grupo infectado e tratado com adjuvante sozinho com diferença estatística quando comparados ao grupo sham.

Foram analisadas citocinas de resposta imune Th17 avaliando o direcionamento da resposta protetora.

Figura 17: Determinação dos níveis de citocinas Th17 do homogenato pulmonar dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10.



Dosagem de citocinas Th1 e Th17 no homogenato pulmonar dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18 e imunizados com peptídeo P10 adjuvantado com DDA/TDB em três diferentes concentrações 250/50µg, 312,5/62,5µg e 500/100 µg .

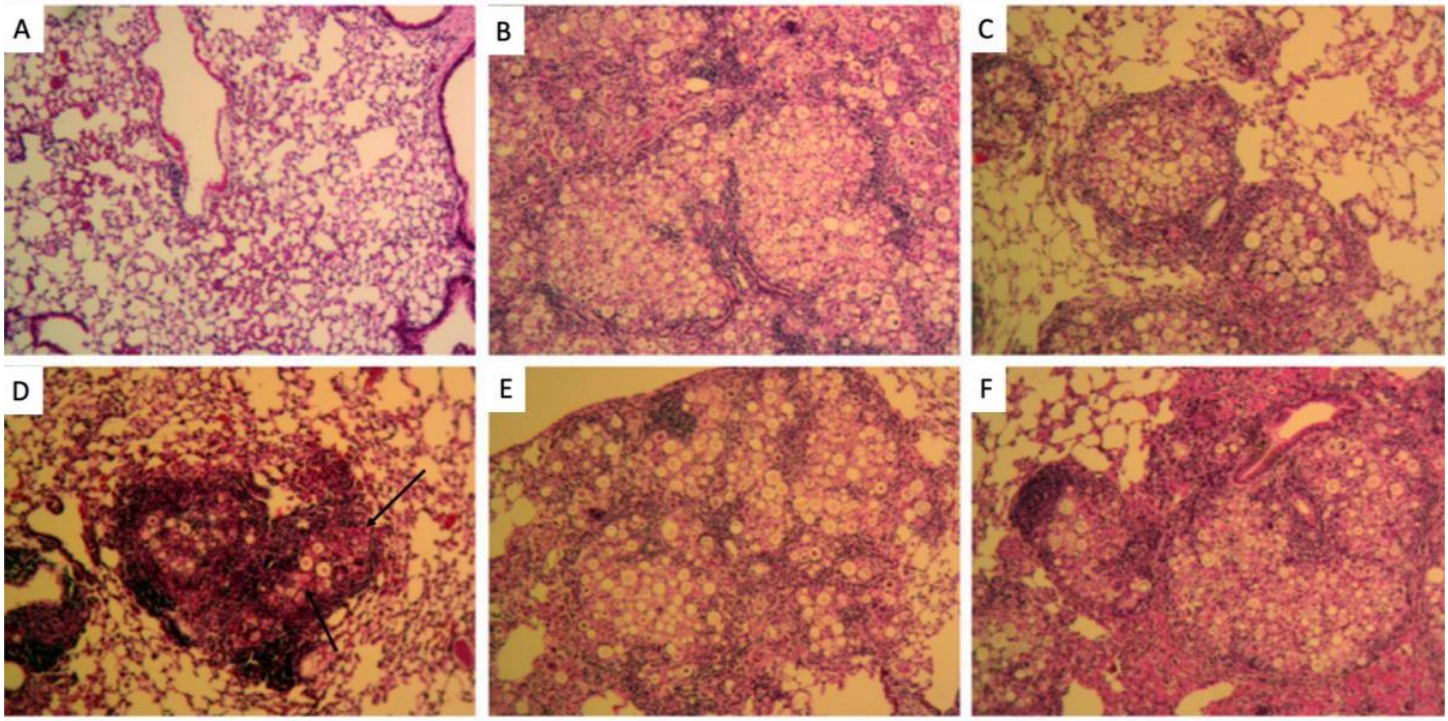
Como representado na figura 17, das citocinas dosadas. Foram quantificados altos níveis de IL-6 no grupo tratado com adjuvante sozinho, o comportamento da citocina mudou com a incorporação do peptídeo com menor nível no grupo DDA/TDB 250µg/50µg/P10 20µg; o aumento na concentração do adjuvante parece induzir a produção da citocina.

Altos níveis de IL-17 foram verificados apenas nos grupos imunizados com DDA/TDB sozinho e DDA/TDB 250/50µg/P10 20µg, às concentrações maiores do adjuvante parece inibir a produção da citocina.

8.5 Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10

A extensão das lesões pulmonares foi avaliada utilizando histologia, coloração de H.E. e GROCOTT. A figura 18 traz as fotomicrografias feitas com estes tecidos.

Figura 18: Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10.

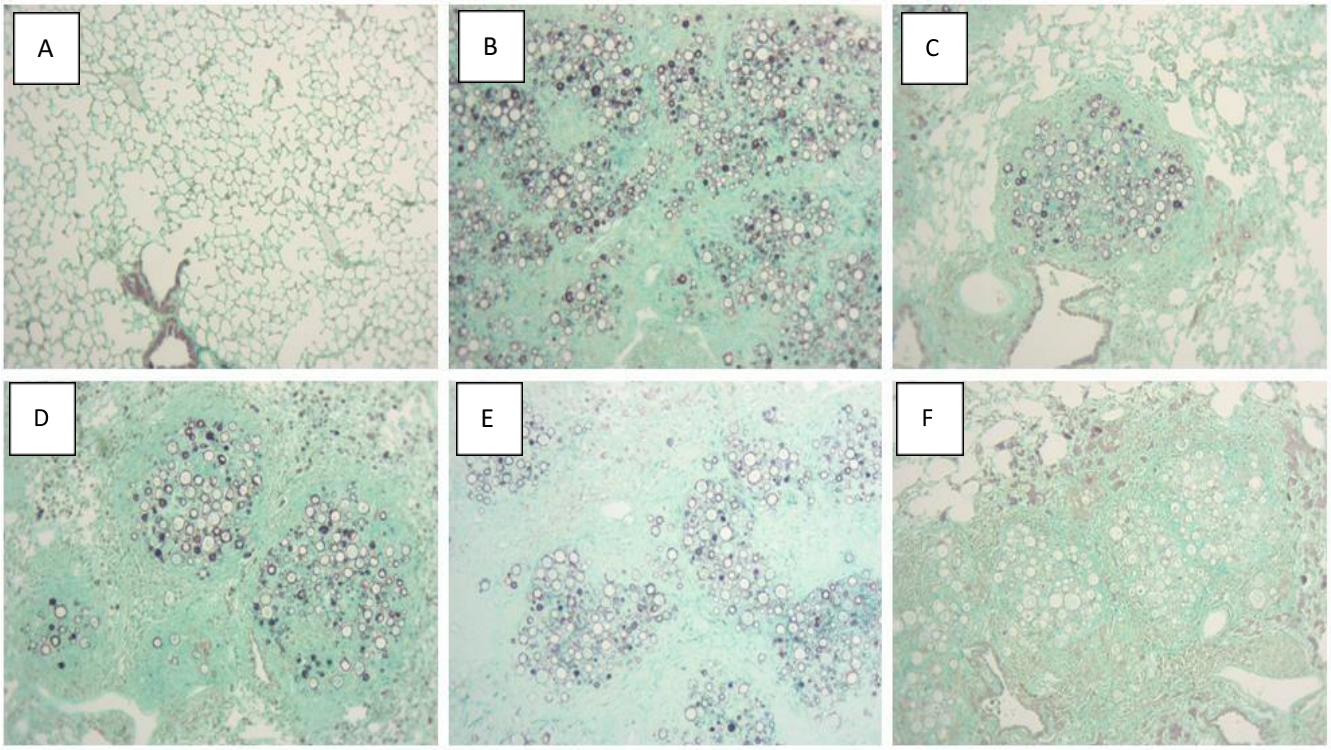


Fotomicrografias das lesões pulmonares dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18 e imunizados com DDA/TDB/P10. O lóbulo esquerdo dos pulmões dos animais foi excisado, acondicionado em formalina 10% em seguida foram embebidos em parafina para as secções do tecido, e corados com H&E. Os grupos controles foram: sham (A), infectado (B) e DDA/TDB (c), os grupos experimentais avaliados foram: DDA/TDB 250/50µg/P10 20µg (D) DDA/TDB 312/62,5µg/P10 20µg (E) e DDA/TDB 500/100µg/P10 20µg (F), as setas indicam a posição do granuloma. (aumento 10x)

A fotomicrografia (figura 18) do grupo sham (A) mostra a estrutura pulmonar, com parênquima livre, ausência de macrófagos ou qualquer tipo de infiltrado. O grupo infectado (B) teve lesões características da PCM, grande quantidade de infiltrado linfo-histiocitário e mononuclear, formando massa densa, granulomas frouxos, ricos em quantidade de levedura e com leveduras dispersas pelo parênquima. As lesões do grupo DDA/TDB (C) são relativamente menores, com infiltrado concentrado nas lesões, granulomas mais compactos, ausência de leveduras dispersa e preservação do parênquima.

As lesões vistas no grupo DDA/TDB 250/50µg/P10 20µg (D) são formadas por granulomas compactos, com infiltrado linfo-histiocitário e mononuclear formando massa densa no granuloma, menor quantidade de leveduras nas lesões, ausência de leveduras pelo parênquima, conservação da estrutura pulmonar. Por outro lado, nos tratamentos realizados com P10 e maiores concentrações de DDA/TDB (312,5/62,5µg/P10 20µg e 500/100µg/P10 20µg) as lesões são mais extensas, os granulomas são frouxos com presença de leveduras nas lesões e dispersas por todo o parênquima, presença maciça de infiltrado.

Figura 19: Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10 coloração de GROCOTT.



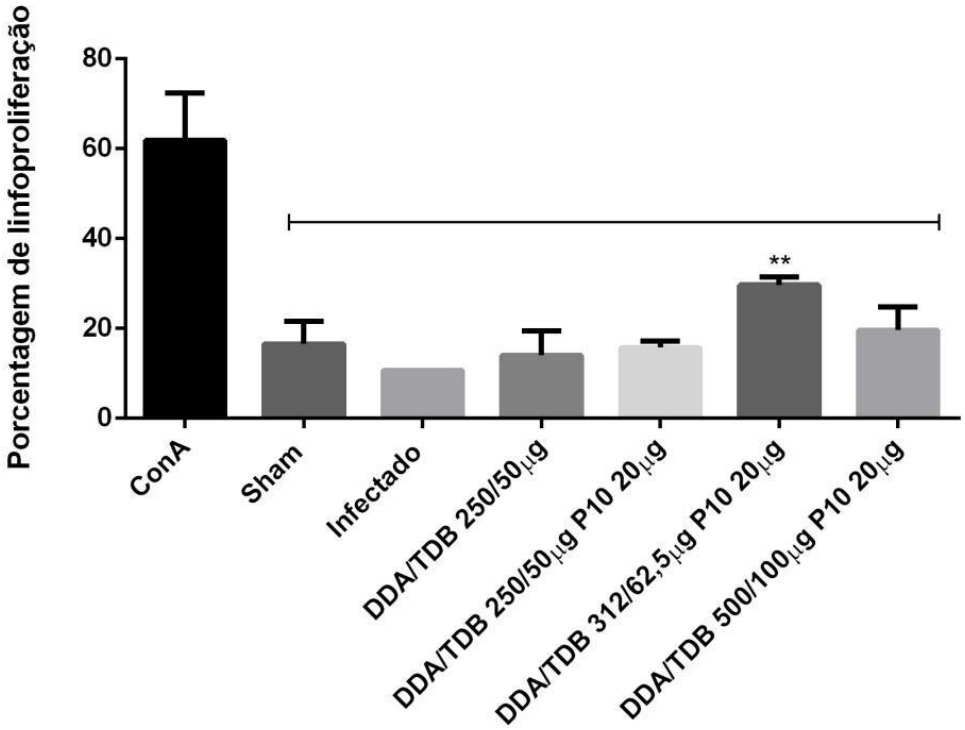
Fotomicrografias do lóbulo esquerdo dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18. As imagens mostram a dispersão das leveduras pelo parênquima pulmonar, os grupos são: sham (A), infectado (B), DDA/TDB 250/50µg (C), DDA/TDB 250/50µg/P10 20µg (D) DDA/TDB 312/62,5µg/P10 20µg (E) e DDA/TDB 500/100µg/P10 20µg (F) (aumento 10X).

As lâminas foram coradas também com GROCOTT para verificar a dispersão das leveduras pelo parênquima pulmonar. As fotomicrografias podem ser visualizadas na figura 19**;** nos grupos infectado e imunizados com adjuvante ou peptídeo/adjuvante o fungo pode ser visto em todas as imagens. No grupo infectado (B), as leveduras aparecem dispersas por todo o parênquima; nos grupos tratados com adjuvante sozinho e DDA/TDB 250/50µg/P10 20µg (C e D), pode se visualizar as leveduras encarceradas nos granulomas, poucas dispersas pelo parênquima. Os grupos imunizados com P10 e concentrações maiores de DDA/TDB (E e F) as leveduras estão mais dispersas pelo parênquima pulmonar e granulomas são menos estruturados.

8.6 Linfoproliferação

No ensaio de linfoproliferação dos linfócitos poplíteos e inguinais foram re-estimulados em cultura celular com peptídeo P10. O resultado do ensaio pode ser visto na figura 20, somente o grupo imunizado com DDA/TDB/ P10, à concentração de 312/62,5µg, teve resposta linfoproliferativa com significância estatística quando comparado ao grupo sham.

Figura 20: Ensaio de linfoproliferação dos linfonodos poplíteos e inguinais na imunização com DDA/TDB/P10.



Os linfócitos derivados dos linfonodos poplíteos e inguinais dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18 e imunizados com P10 na presença de DDA/TDB foram cultivados em meio RPMI 1640 suplementado e ficaram acondicionados á uma temperatura de 37°C, 5% CO_2 por 72 horas. Como estímulo foi utilizado o peptídeo P10 20µg/mL e mitógeno controle ConA 4µg/mL (P<0,01).**

Os grupos controles (sham, infectado e DDA/TDB sozinho) apresentaram níveis de proliferação basal, e o grupo imunizado com P10 e maior concentração de DDA/TDB (500/100µg) mostrou tendência a proliferar, mas sem significância estatística.

8.7 Avaliação das populações celulares pulmonar

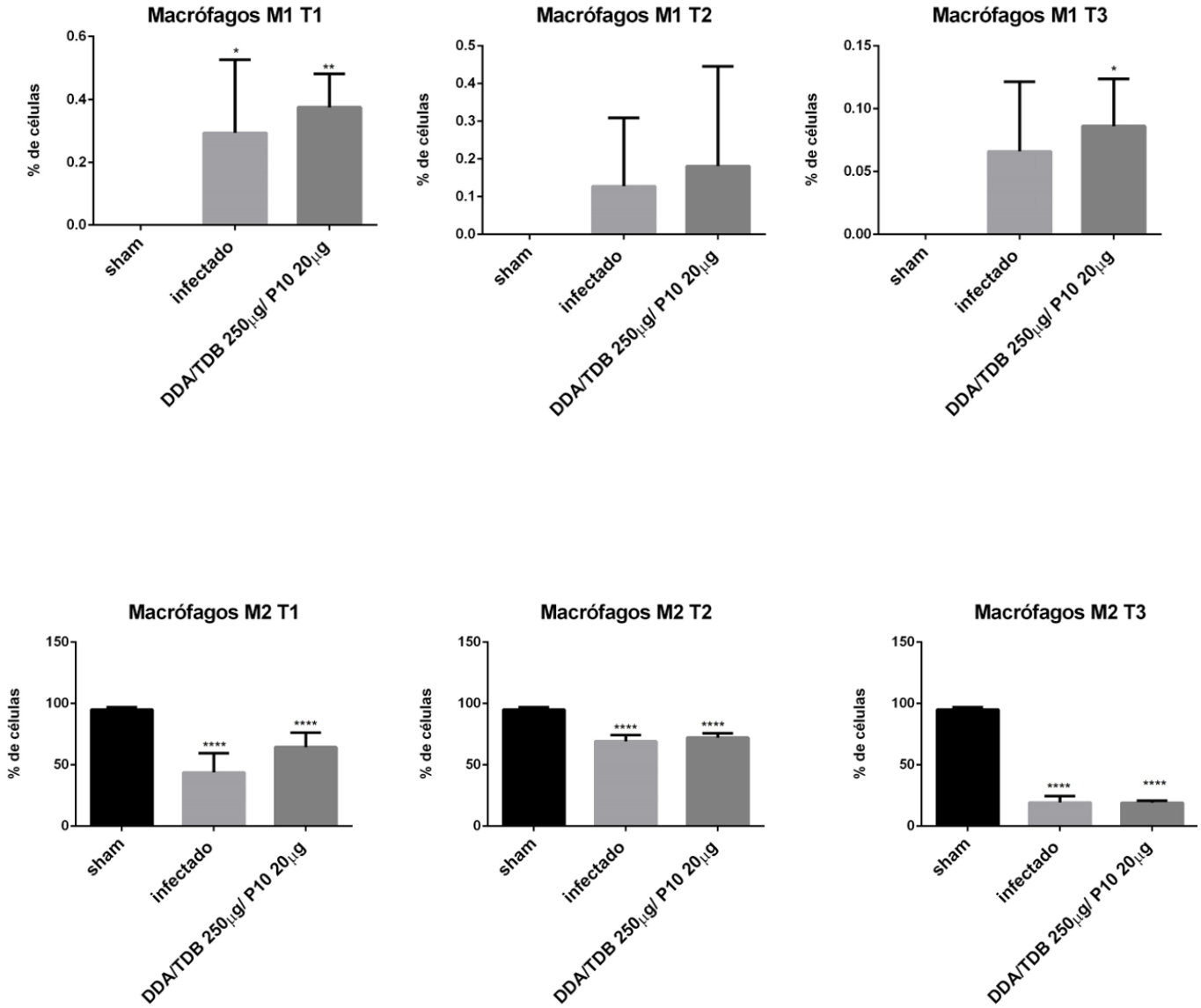
Diante dos resultados positivos na indução da resposta imune protetora, com o complexo DDA/TDB/P10, procedeu se outra etapa do estudo; a avaliação das populações presentes nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18 e imunizados com DDA/TDB/P10.

Para esse estudo foram utilizados maior número de animais por grupo (15 animais/grupo) e em cada etapa 5 animais, de cada grupo, foram sacrificados. A infecção e as imunizações foram realizadas como descrito anteriormente, e 5 dias após cada imunização os camundongos foram sacrificados. Os pulmões foram retirados e as células foram separadas como referido no item 4.16, e em seguida, marcadas com anticorpos de superfície celular e intracelular. O resultado foi analisado no citômetro de fluxo LSR Fortessa/BD do laboratório de desenvolvimento de vacinas do ICBII/USP, os grupos selecionados para o estudo foram:

- grupo sham (não infectado)
- grupo infectado
- grupo tratado com DDA/TDB 250µg/50µg/P10 20µg

O estudo foi destinado a identificação das populações de macrófagos M1/M2 e linfócitos (T $CD4^+$ e T $CD8^+$) com anticorpos específicos. A identificação dos macrófagos foi realizada com a estratégia: $CD45^+CD11b^+CD11c^-CD64^+CD24^-$ dessa marcação as populações foram separadas em: macrófago M1 ($CD38^+Egr2^-$) e macrófago M2 ($CD38^-Egr2^+$), e cada população foi avaliada a ativação celular através da marcação de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86). O resultado da fenotipagem é representado em MFI (intensidade média de fluorescência) ou em porcentagem (%) de células.

Figura 21: Fenotipagem das populações pulmonares dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10.



Cinética de fenotipagem, as células dos pulmões foram marcadas com anticorpos específicos para o reconhecimento de macrófagos ($CD45^{+}CD11b^{+}CD11c^{-}CD64^{+}CD24^{-}$) M1 ($CD38^{+}EgR2^{-}$) e M2 ($CD38^{-}EgR2^{+}$). Os camundongos foram infectados com Pb18 e 30 dias após a infecção iniciou se o tratamento. 5 dias após cada imunização ocorreu o sacrifício e foi avaliado as mudanças fenotípicas em três momentos diferentes (T1 a T3), os resultados são mostrados em MFI (intensidade média de fluorescência).

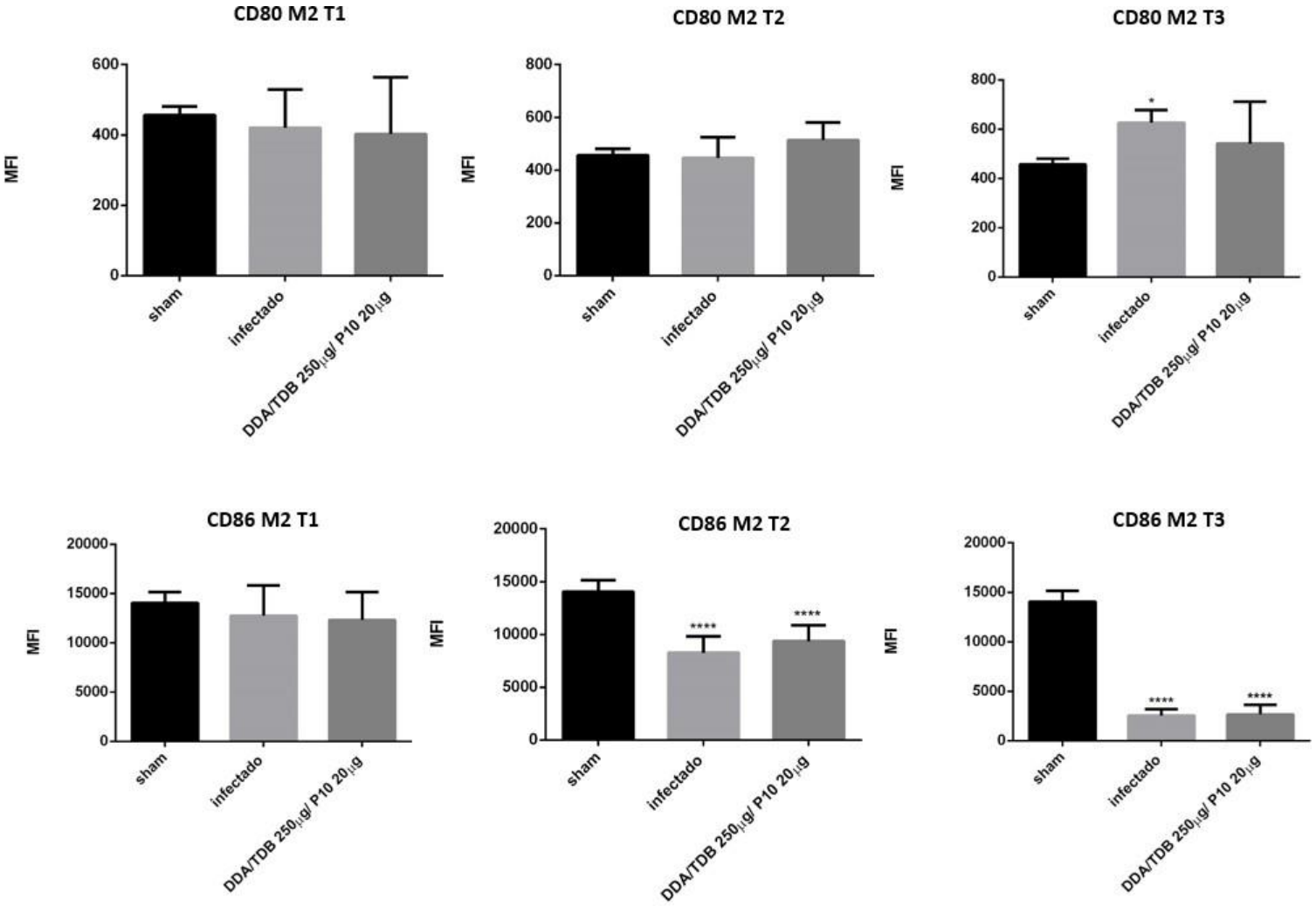
Foram observadas algumas alterações nas populações de macrófagos durante os intervalos de imunização observado. No primeiro intervalo, foi encontrado alta intensidade de macrófagos M1 no grupo infectado (M1 T1), como pode ser visto na figura

21. Durante os outros intervalos analisados, esta mesma população teve sua intensidade mantida no grupo infectado, e aumentada no grupo imunizado (M1 T2). O último intervalo de tempo verificado, a intensidade de macrófagos M1 (T3) diminuiu nos dois grupos (infectado e imunizado) à mesma frequência do grupo sham (não infectado).

A infecção mostrou que a quantidade de macrófagos M2 é relativamente menor nos grupos infectados e imunizados. Nos três intervalos verificado (T1 – T3) as populações de M2 foram significantemente menores nesses grupos comparados ao grupo sham (não imunizado). Entre os dois grupos (infectado e imunizado) ocorreu variação na intensidade das populações de macrófagos M2 nos últimos intervalos de tempo verificado (T2 e T3) porém, sem significância entre eles.

A ativação dos macrófagos M2 foi analisada pela frequência de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) e o resultado foi representado na figura 22.

Figura 22: Análise de moléculas co-estimulatórias das células pulmonares dos camundongos C57Bl/6.

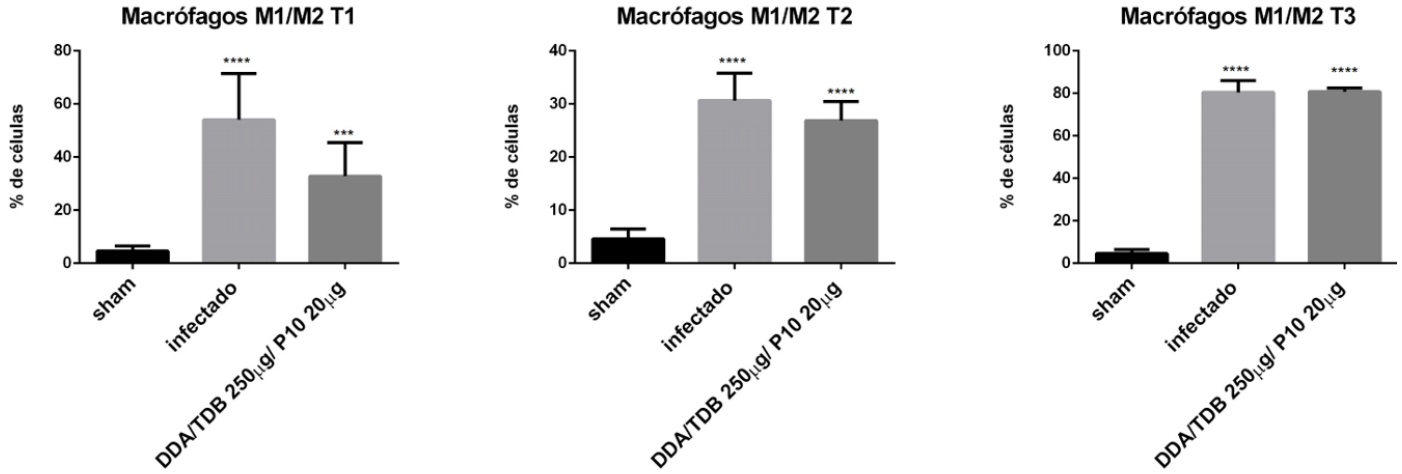


Cinética de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) dos macrófagos M2 (CD38^{-}EgR2^{+}). A análise foi feita em 3 tempos diferentes do experimento, sempre 5 dias após cada imunização (35, 50 e 65 dpi). As populações foram identificadas nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18 e imunizados com DDA/TDB/P10.

A análise feita de CD80 dos macrófagos M2, indicaram pouca expressão da molécula. Durante o experimento, a intensidade desta molécula sofre pouca alteração tendo expressão semelhante ao grupo sham; no último intervalo de tempo verificado (T3), a molécula teve sua intensidade aumentada no grupo infectado e imunizado, mas a significância estatística foi encontrada apenas no grupo infectado, quando comparado ao controle sham. Por outro lado, avaliando a frequência da molécula CD86, dos macrófagos M2, é possível observar que, a célula tem expressão de CD86 diminuída ao longo da infecção. No primeiro intervalo (T1) a frequência dos grupos foi semelhante, porém, os grupos infectados e imunizados tiveram a frequência de CD86 diminuída nos últimos intervalos de tempo verificados (T2 e T3)

Durante o experimento foi encontra uma população de células rica em macrófago duplo positivo ($CD38^{+}EgR2^{+}$) M1/M2, e foi avaliado a variação na quantidade dessas células ao longo do experimento.

Figura 23: Identificação das populações de macrófagos duplo positivo M1/M2.



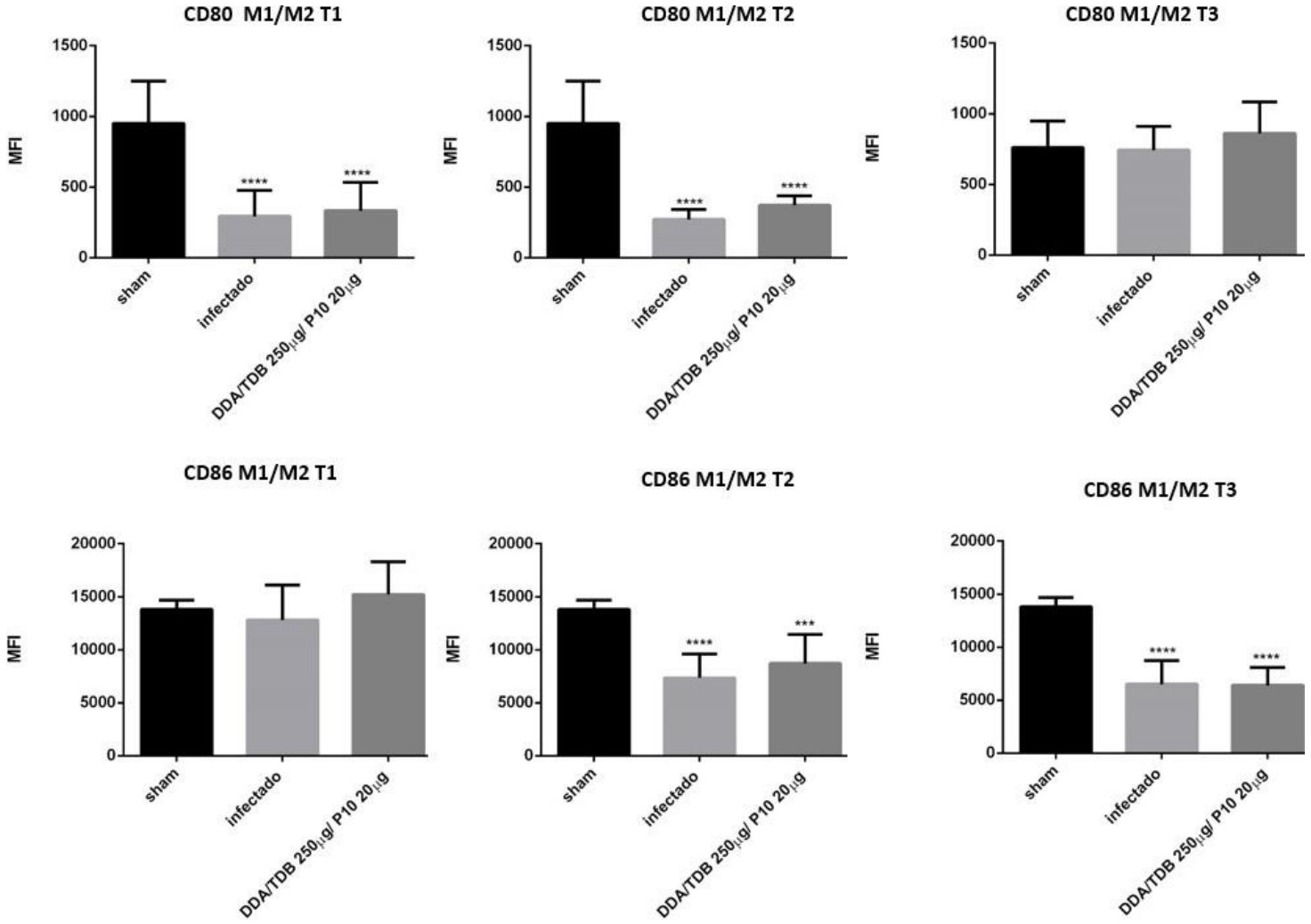
Os macrófagos M1/M2 dos pulmões dos camundongos C57Bl/6, foram identificados através dos marcadores celulares $CD38^{+}EgR2^{+}$. As populações foram analisadas em três diferentes intervalos de tempo do experimento, sempre 5 dias após a imunização com DDA/TDB/P10.

Como visto na figura 23, macrófagos M1/M2 foram encontrados nos pulmões do grupo infectado e no grupo imunizado no primeiro intervalo do experimento (T1). Os macrófagos M1/M2 tiveram diminuição na sua intensidade, nos dois grupos, no segundo intervalo de tempo verificado (T2), e ao final do experimento, a intensidade de macrófagos M1/M2 se igualaram em todos os grupos (T3).

A atividade dos macrófagos duplo positivos foi mensurada pela expressão das

moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86. O resultado da análise está representado na figura 24.

Figura 24: Cinética das moléculas CD80 e CD86 dos macrófagos M1/M2.



Cinética realizada das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 em três períodos diferentes do experimento (T1, T2 e T3) avaliando o comportamento das moléculas nos macrófagos duplo positivo M1/M2 ($CD38^{+}EgR2^{+}$) após cada imunização. Os resultados foram representados em MFI (Intensidade média de fluorescência)

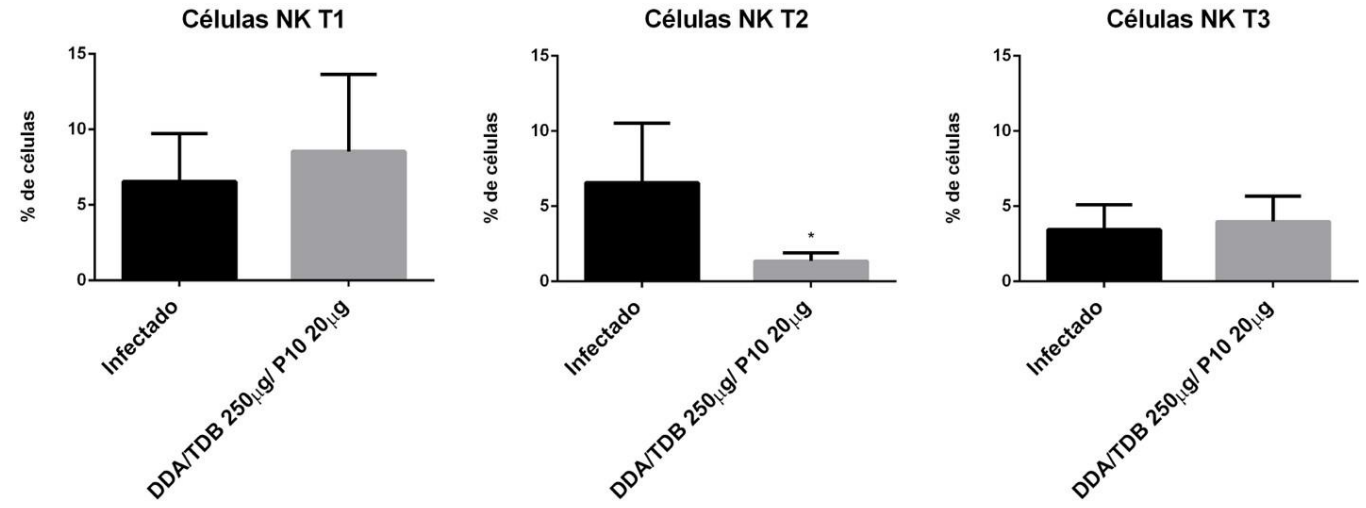
A atividade dos macrófagos M1/M2 teve expressão inversamente proporcional entre as moléculas CD80 e CD86. No início do experimento (T1 e T2), a molécula CD80 teve baixa intensidade nos grupos infectado e imunizado, menores estatisticamente que o grupo sham. No último intervalo verificado, a intensidade da molécula aumentou nesses grupos semelhante ao grupo sham (T3).

A molécula CD86, teve expressão inversa na sua frequência comparada à molécula CD80. No início do experimento (T1), sua expressão é semelhante nos três grupos avaliados. Nos outros intervalos (T2 e T3) a molécula teve diminuição em sua

expressão nos grupos infectado e imunizado, com diferença estatística quando comparado a CD86 ao grupo sham.

Foi avaliado também a presença das células NK nos três intervalos do experimento. A quantidade de células NK encontrada nos pulmões dos animais, teve alteração no segundo intervalo do experimento, onde a população dessas células diminui estatisticamente quando comparado ao grupo infectado (figura 25). Ao final do experimento, as populações de células NK diminuíram dos dois grupos e foram semelhantes em ambos, sem diferença.

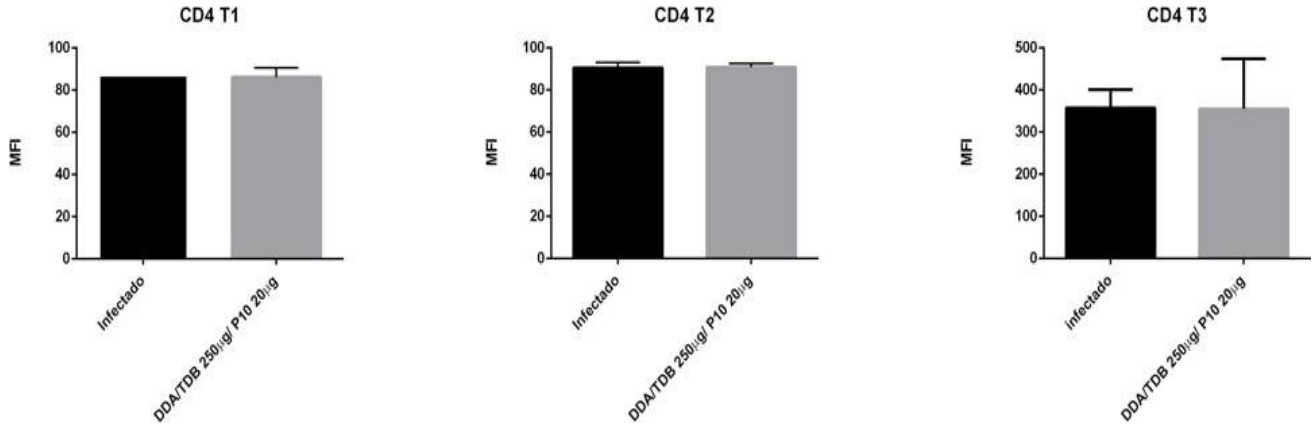
Figura 25: Análise das populações de células NK nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10.



As populações de células NK foram identificadas nos pulmões dos camundongos infectados com Pb18 e imunizados com DDA/TDB/P10. Foram utilizados os anticorpos $CD3^{-}CD49b^{+}Nkp46^{+}$ para identificação das células. As células foram quantificadas em 3 intervalos de tempo, 5 dias após cada imunização.

O estudo da cinética dos linfócitos T $CD4^{+}$ foi realizado para avaliação do comportamento dessas células frente a imunização com DDA/TDB/P10. A figura 26 traz o resultado desse estudo, e como pode ser visualizado, não houve diferença no MFI dos linfócitos $CD4^{+}$ entre os dois grupos estudados em nenhum dos intervalos verificados,

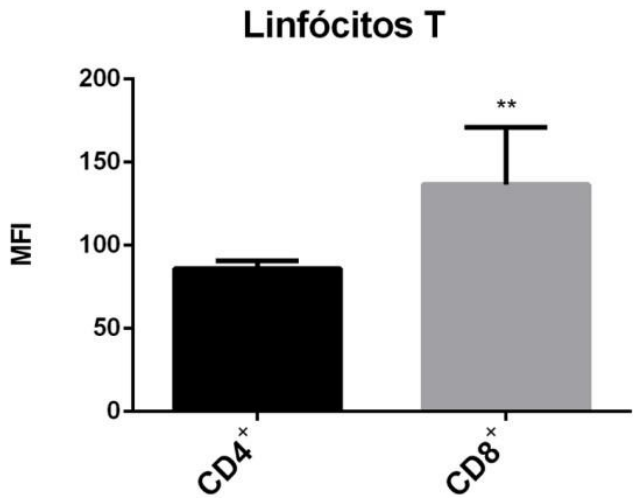
Figura 26: Cinética dos linfócitos $CD4^{+}$ nos pulmões dos animais imunizados com DDA/TDB/P10.



Os linfócitos originários dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 foram marcados com $CD45^+CD3^+CD4^+$ e avaliada a cinética em três períodos diferentes do tratamento, 5 dias após cada imunização. As populações dos grupos infectado e tratado com DDA/TDB/P10 20µg estão representadas em MFI.

Avaliou se também a diferença nas populações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ ao final do tratamento com DDA/TDB/P10 (figura 27).

Figura 27: Correlação entre os linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ dos pulmões dos animais C57Bl/6 imunizados com DDA/TDB/P10



Ao final do experimento, foi realizada a identificação dos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18 e imunizados com DDA/TDB/P10. Os linfócitos foram identificados pelos anticorpos de superfície celular $CD3^+CD4^+CD8^+$.

A identificação dos linfócitos mostrou que a frequência os linfócitos $CD8^+$ foram mais abundantes que os linfócitos $CD4^+$. Embora o adjuvante DDA/TDB e o peptideo P10 tenham características favoráveis a indução da resposta de perfil Th1, não foram encontradas diferenças estatísticas no perfil dos linfócitos T $CD4^+$ nos intervalos T1 – T3; quando avaliamos as diferenças entre os linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$, foi observado predominância de população T $CD8^+$.

9. Capítulo 4 – Efeito do agonista α-GalCer sobre a imunização com peptídeo P10

9.1 Análise do efeito imunoestimulador do glicolipideo α-GalCer (α-galactosilceramida) sobre o peptídeo P10

Foi realizado paralelo ao estudos com DDA e P10, a análise do efeito imunoestimulador do glicolípideo α-GalCer e o peptídeo P10 sobre a resposta induzida pela associação de ambos na PCM experimental. Este estudo foi feito em colaboração com o Prof. Dr. Alexandre de Castro Keller do Laboratório de Imunopatologia Experimental (LIPE), do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP). Nesse estudo foi utilizada a linhagem de camundongo BALB/c; a infecção procedeu como descrita no item 4.10 utilizando leveduras de Pb18 por via intratraqueal. Trinta (30) dias após a infecção foi realizado a imunização utilizando α-GalCer e P10, associados ou não, por via intranasal.

Na primeira etapa do estudo, foi avaliado glicolipídeo associado ao P10 e a indução da resposta imune. Para esta análise foram utilizados os grupos:

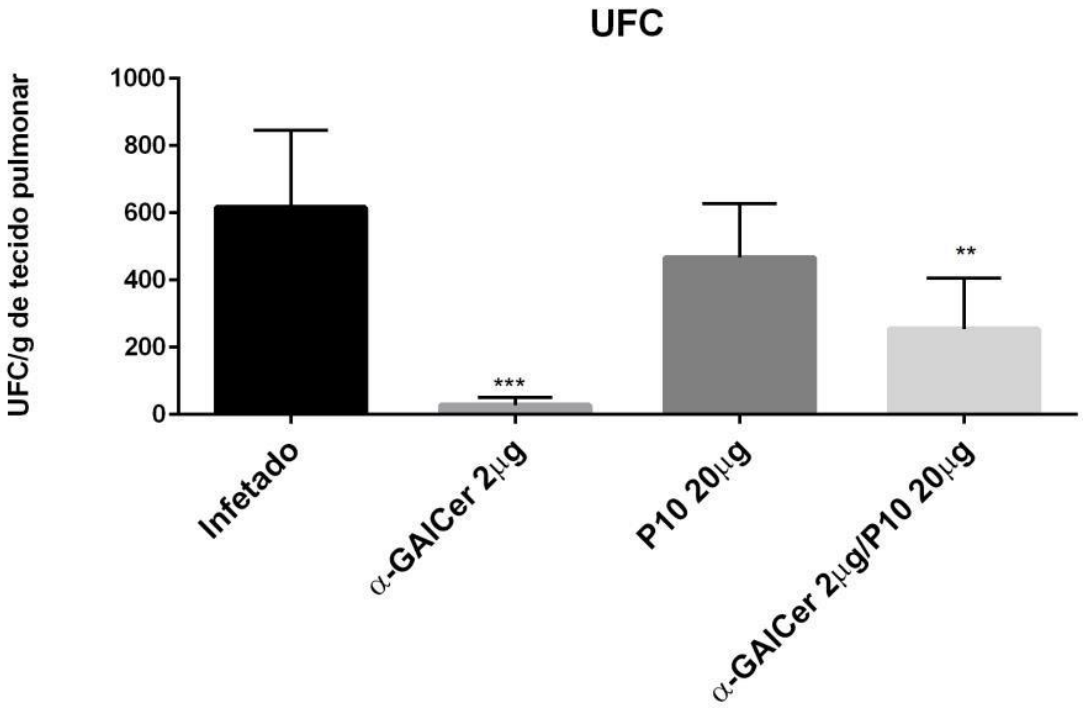
- grupo PBS (controle não infectado)
- grupo infectado
- grupo imunizado com α-GalCer 2μg (dose única)
- grupo imunizado com P10 20μg (3 doses em intervalos semanais)
- grupo imunizado com α-GalCer 2μg/P10 20μg (1˚dose α-GalCer/P10, doses subsequentes apenas P10 20μg, em intervalos semanais)

Sete dias após a última imunização os animais foram sacrificados e realizada a avaliação do tratamento pela contagem de UFC, dosagem de citocinas por ELISA e histologia.

9.2 Avaliação da resposta imune induzida pela associação α-GalCer/P10 via intranasal

Inicialmente foi analisado a carga fúngica dos pulmões dos animais infectados com Pb 18 e tratados com α-GalCer/P10. A administração de 2μg α-GalCer indicou ser um bom agonista da resposta imune protetora, capaz de diminuir a quantidade de leveduras viáveis nos pulmões dos animais infectados (figura 28). Os grupos que receberam o glicolipídeo sozinho ou associado ao peptídeo P10 tiveram redução significante da carga fúngica quando comparado ao grupo infectado (controle).

Figura 28: Contagem das UFC dos animais BALB/c imunizados com P10 e -GalCer via intranasal.

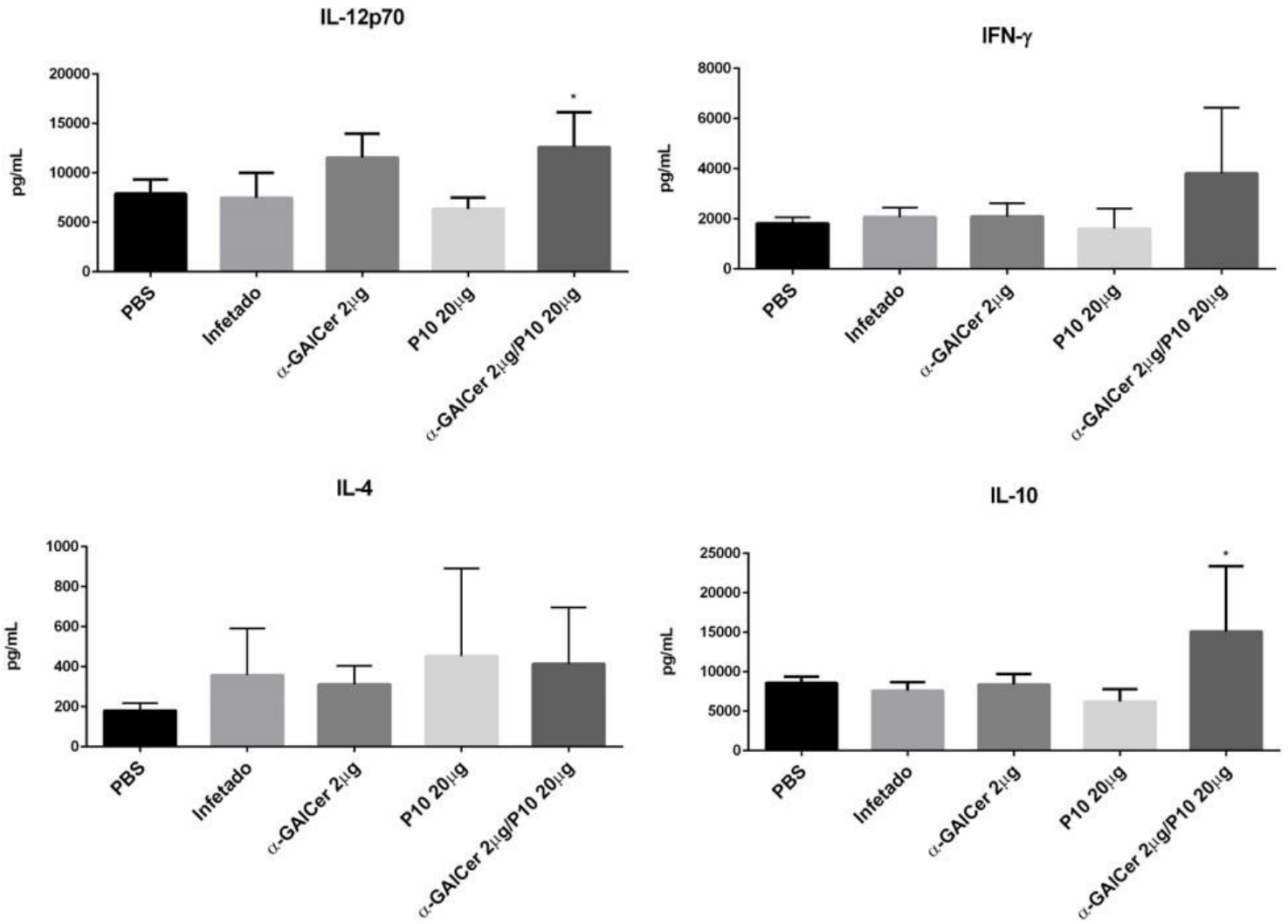


Contagem de células viáveis dos pulmões (representado em UFC/g de tecido) dos camundongos BALB/c infectados com P18, trinta dias após infecção os animais foram imunizados com -GalCer sozinha (dose única), P10 sem adjuvante (3 doses) e -GalCer/P10 (dose única/três doses respectivamente). Os animais receberam tratamento via intranasal com 10L em cada narina em intervalos semanais.

O tipo de resposta imune induzida pela imunização com α-GalCer/P10 foi avaliado dosando se as citocinas do homogenato pulmonar pelo método de ELISA. O resultado da quantificação das citocinas está representado na figura 26.

A imunização com α-GalCer, P10 e α-GalCer/P10 não induziu aumento nos níveis de IL-4 nos camundongos BALB/c infectados com Pb18. A citocina IL-10 apresentou altos níveis no grupo imunizado com o complexo α-GalCer/P10, o mesmo grupo apresentou altos níveis de IL-12p70 e IFN-α, esta última sem significância estatística. Diante esse resultado, concluímos que o complexo α-GalCer/P10 foi um bom indutor de resposta imune protetora, aumentando os níveis de citocina IL-12 (Th1) e sem alterar os níveis de IL-4 (Th2).

Figura 29: Quantificação dos níveis de citocinas Th1 eTh2 do homogenato pulmonar dos camundongos BALB/c imunizados com P10 e α-GalCer via intranasal.

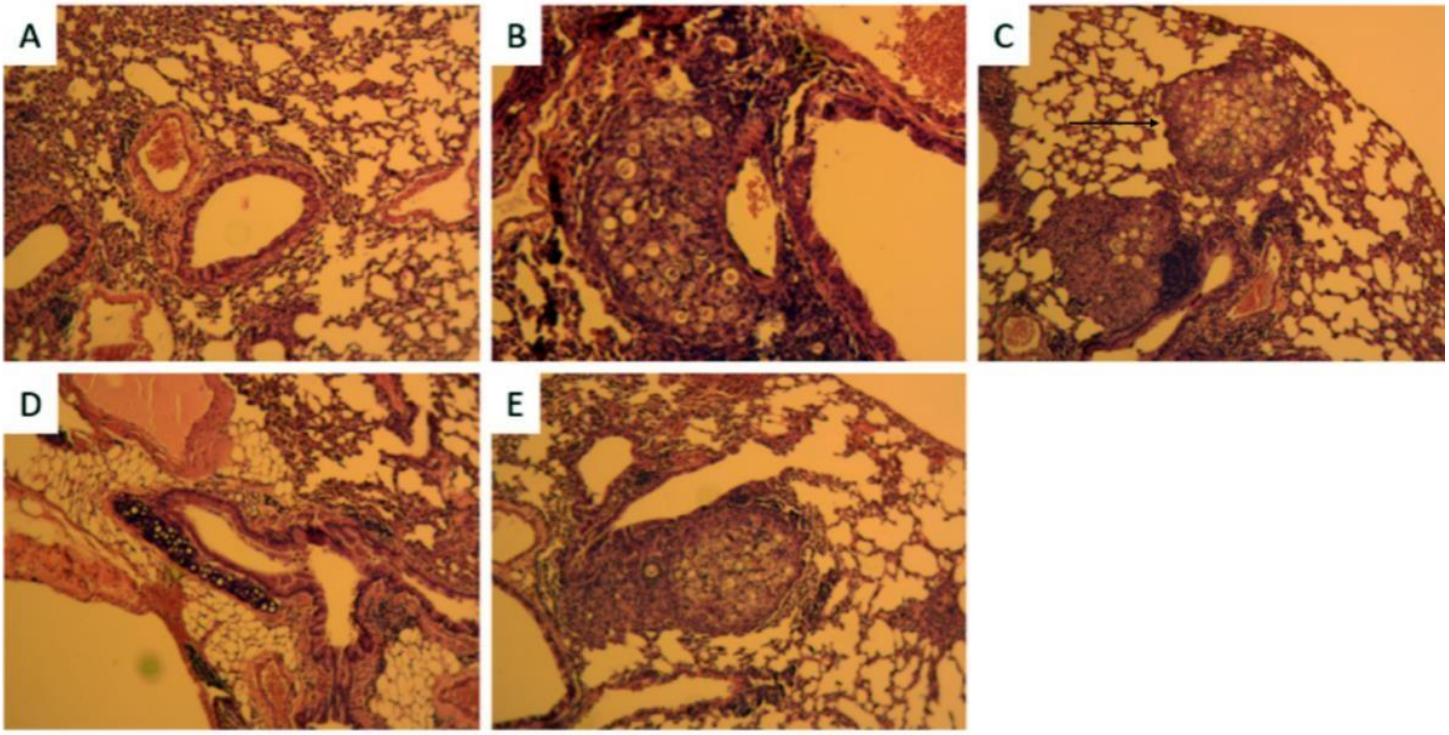


A avaliação de citocinas de resposta imune Th1 (IL-12 e IFN-γ) e Th2 (IL-4) do homogenato dos pulmões dos camundongos BALB/c infectados com Pb18 e imunizados com P10 associado aou não à α-GalCer associado . A quantificação foi feita pelo método de ELISA e os resultados expressos em picograma/mL.

As lesões pulmonares causadas pela PCM foram avaliadas através da análise histológica. A fotomicrografia (figura 30) do grupo PBS (não imunizado) (A), mostra a estrutura do parênquima pulmonar livre, sem presença de macrófagos; a fotomicrografia do grupo infectado (B), mostra lesões granulomatosas características da PCM, com presença de leveduras, infiltrado mononuclear e histiocitário com morfologia compacta do granuloma. O grupo imunizado com P10 (C) apresenou também alguns granulomas com infiltrado formando massa densa e bem estruturados. O grupo imunizado apenas com α-GalCer (D) não foi encontrado granuloma ou leveduras nos cortes histológicos.

No grupo imunizado com α-GalCer/P10 (E), foram encontrados poucos granulomas pelo parênquima pulmonar, sendo eles compactos, com presença robusta de infiltrado mononuclear e histiocitário, e preservada estrutura do parênquima.

Figura 30: Análise histológica dos pulmões dos camundongos BALB/c imunizados com α-GalCer/P10.



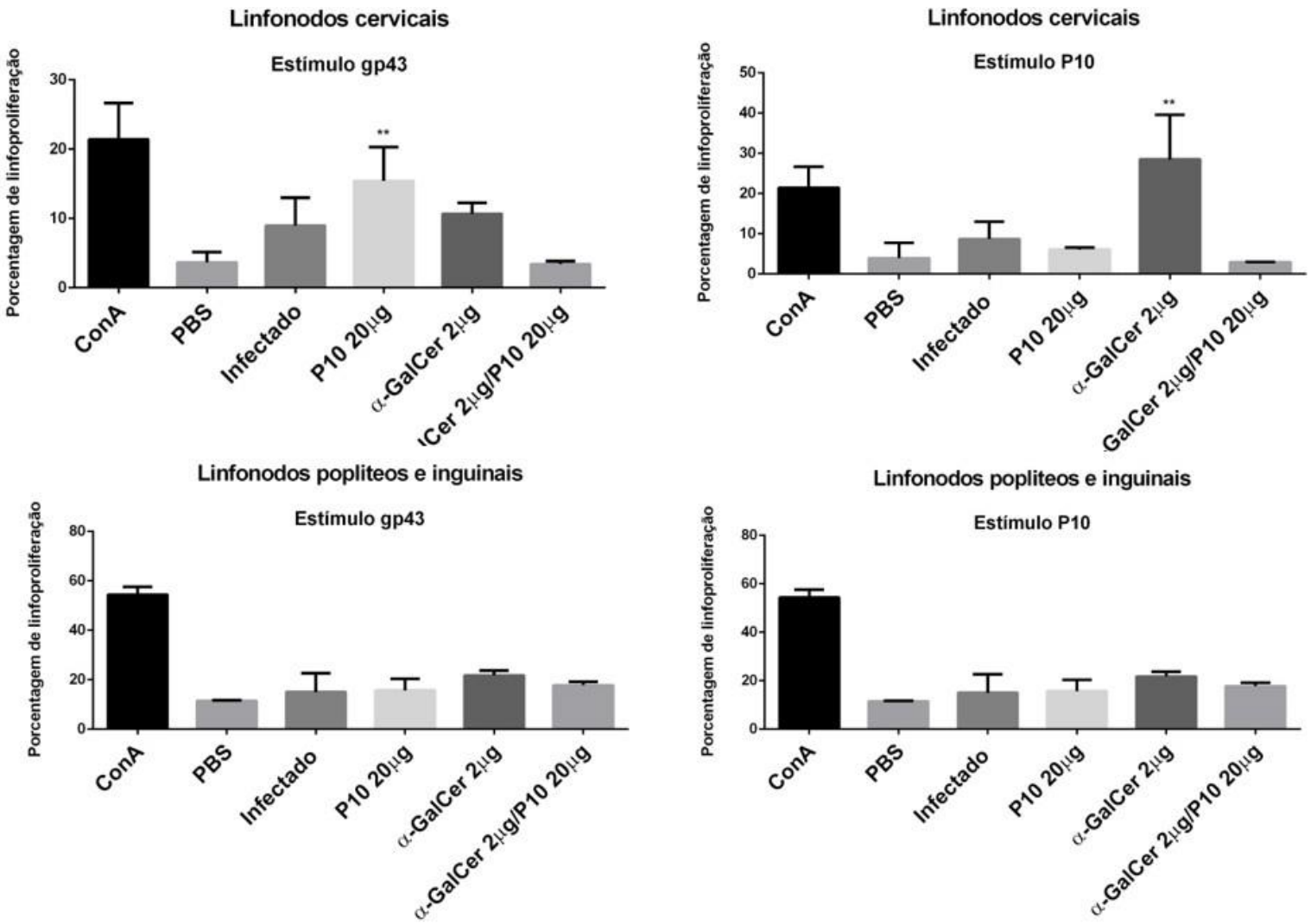
O lóbulo esquerdo dos pulmões dos camundongos foi armazenado em formalina 10%, em seguida embebidos em parafina e seccionados em micrometro, foi utilizado a coloração H.E para visualizar as estruturas do parênquima pulmonar. As secções trazem as micrografias dos grupo PBS(A), infectado (B), P10 20µg (C), α- GalCer/P10 (E), o grupo imunizado com α-GalCer (D) não apresentou estruturas granulomatosas. (aumento 10x).

Também foi realizado o ensaio de linfoproliferação dos linfócitos dos linfonodos poplíteos, inguinais e cervicais dos animais BALB/c. Nesse ensaio, além do mitógeno utilizado como controle positivo (ConA) foram utilizados como estímulo a glicoproteína de 43 kDa (gp43) de *P. brasiliensis* a uma concentração de 10µg/mL, além do peptídeo P10 (20µg/mL).

Os resultados obtidos mostraram que os linfócitos dos linfonodos cervicais foram responsivos ao re-estímulo (figura 31) enquanto que os linfócitos dos linfonodos inguinais e poplíteos não apresentaram atividade linfoproliferativa. A proliferação foi dependente do estímulo: quando os linfócitos cervicais foram re-estimulados com peptídeo P10, o grupo imunizado com α-GalCer 2µg apresentou maior resposta proliferativa que os outros grupos. Quando a glicoproteína gp43 foi utilizada como re-estímulo, o grupo imunizado com o peptídeo P10 apresentou maiores taxas de linfo

proliferacao, em comparação aos outros grupos.

Figura 31: Avaliação da resposta linfoproliferativa dos linfonodos cervicais, poplíteos e inguinais.



Análise da capacidade linfoproliferativa dos linfócitos dos linfonodos poplíteos e inguinais e cervicais dos camundongos BALB/c infectados e imunizados com α-GalCer e P10. Os linfócitos foram plaqueados em meio RPMI1640 suplementado, como controle positivo foi utilizado o mitógeno utilizado ConA nos grupos experimentais foram utilizados como estímulo P10 20µg/mL ou gp43 10µg/mL. Os resultados foram expressos em porcentagem de linfoproliferação.

9.3 Análise da imunização intranasal com o glicolipídio α-GalCer e tratamento antifúngico com sulfamethoxazol/trimetoprim (Bactrin)

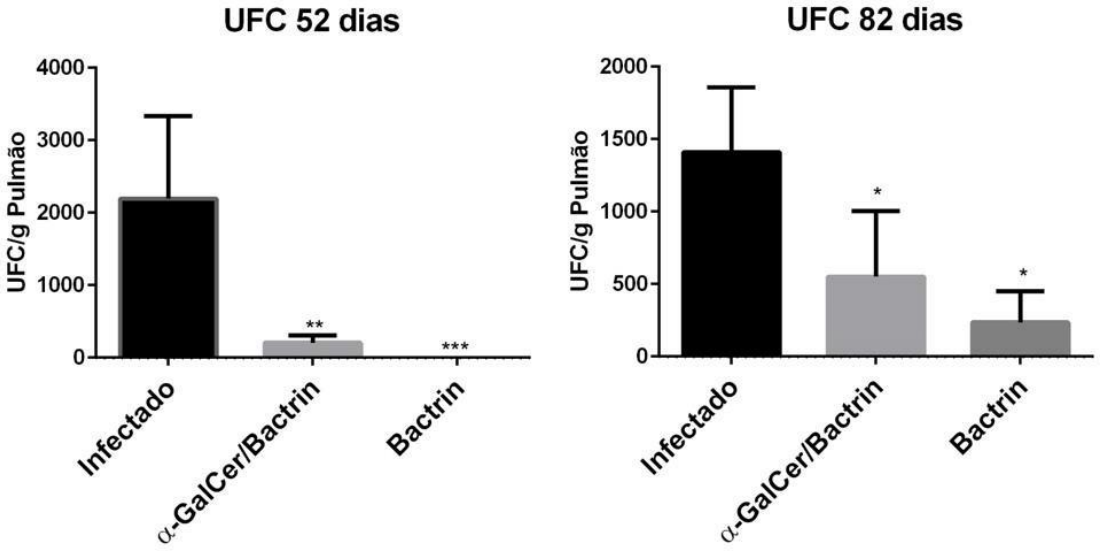
Os resultados obtidos com α-GalCer e peptídeo P10 na imunização intranasal, nos levaram a estudar outras propostas da associação. Uma questão levantada durante o tratamento da PCM são as recidivas após o regime antifúngico, foi então elaborado um ensaio para analisar o modelo de recidiva em PCM. Os camundongos BALB/c foram tratados com sulfamethoxazol e trimetropim (Bactrin) concomitante a imunização com

α-GalCer. Para o estudo, parte do grupo de animais foi sacrificado com 52 dias após a infecção (52dpi) e outra parte sacrificada 82 dias após a infecção (82dpi). Os grupos utilizados no ensaio foram:

- grupo PBS (não infectado)
- grupo infectado
- grupo imunizado com α-GalCer/Bactrin (2µg intranasal dose única, Bactrin intraperitoneal por 21 dias)
- grupo tratado com Bactrin (intraperitoneal 21 dias).

Após o sacrifício, foi avaliado o número de células viáveis (UFCs) dos pulmões dos animais infectados e tratados (figura 32).

Figura 32: Análise das UFCs dos pulmões dos camundongos BALB/c no tratamento intranasal associado ao tratamento antífungico.



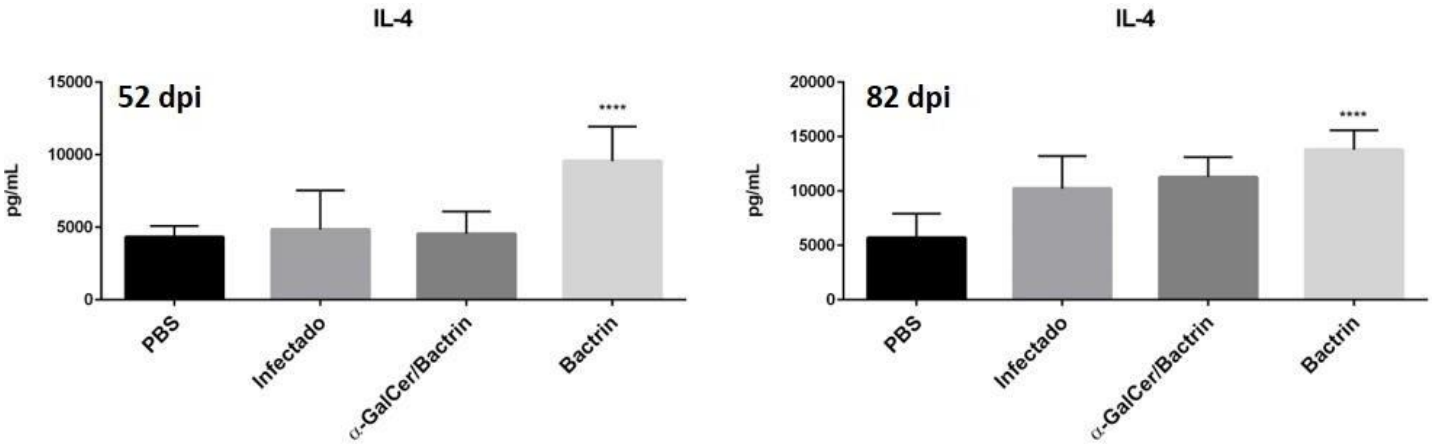
Análise das células viáveis dos pulmões dos camundongos BALB/c imunizados com α-GalCer e tratados com Sulfamethaxazol (Bactrin) em dois intervalos de tempo 52 e 82 dias após a infecção. Os dados foram expressos em UFC/grama de tecido (Pulmão).

A contagem de UFCs dos grupos de animais sacrificados com 52 dias mostrou eficiência no tratamento com α-GalCer/Bactrin e Bactrin com diminuição robusta na carga fúngica de ambos os grupos, com diferença estatística em ambos grupos quando comparado ao controle (infectado) (figura 28). Por outro lado, a leitura realizada aos 82 dias após a infecção, demonstrou diminuição da carga fúngica dos animais tratados com

α-GalCer/Bactrin e Bactrin porém, houve aumento na quantidade de UFCs em relação à contagem anterior (52dpi), levando nos a concluir que o tratamento com o glicolipideo embora favoreça a indução de resposta protetora, não produziu resposta de longo termo, não evitando a recidiva.

As citocinas do homogenato pulmonar dos camundongos tratado com α-GalCer e Bactrin foram quantificadas a fim de se determinar o tipo de resposta imune presente no tratamento. As citocinas foram dosadas nos dois intervalos de tempo (52 e 82 dias) para avaliar diferenças nos níveis durante os intervalos do tratamento (figura 33 e 34).

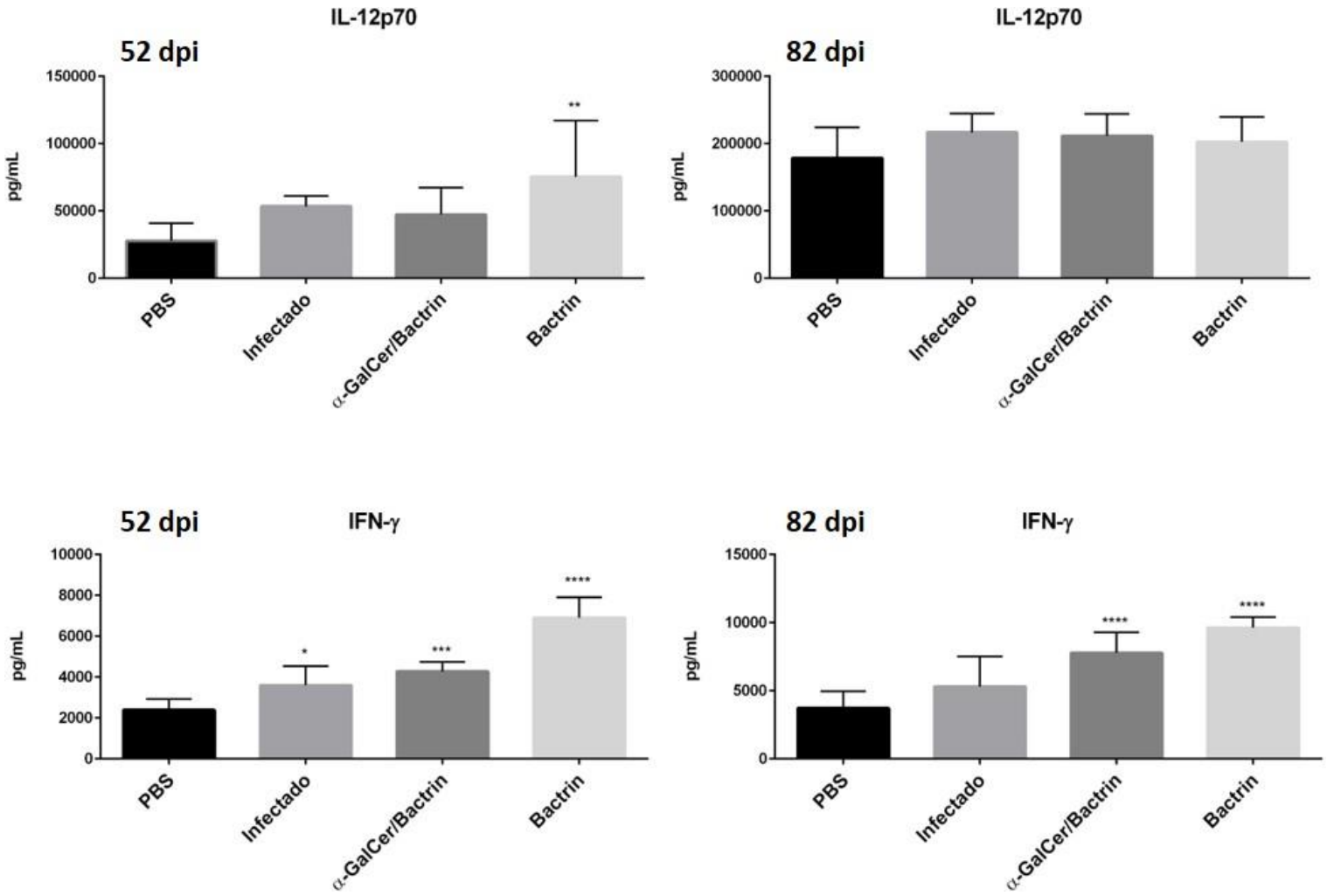
Figura 33: Quantificação das citocinas no homogenato pulmonar dos animais tratados com α-GalCer associado ao tratamento com Bactrin.



A citocina IL-4 foi mensurada no homogenato pulmonar dos camundongos BALB/c em dois períodos diferentes, 52 dias (esquerda) e 82 dias (direita). Os resultados foram expressos em picograma/mL.

A citocina IL-4 (figura 33) não apresentou diferença em seus níveis nos grupos infectado e imunizado com α-GalCer/Bactrin, em nenhum dos intervalos de tempo medido, quando comparado ao grupo controle (PBS). Os níveis da citocina desses grupos aumentaram após o fim do tratamento, mas não houve diferença estatística. Por outro lado, o grupo tratado apenas com o antifúngico, apresentou altos níveis, quando comparado ao grupo PBS (não infectado), nos dois intervalos, com significância estatística.

Figura 34: Quantificação de citocinas pró-inflamatórias do homogenato pulmonar dos camundongos tratados com α-GalCer associado ao tratamento antifúngico Bactrin.



As citocinas pró-inflamatórias Th1 (IL-12 e IFN-γ) do homogenta pulmonar tiveram seus níveis dosados nos dois intervalos de tempo do experimento (52 dias – esquerda e 82 dias – direita) pelo método de ELISA.

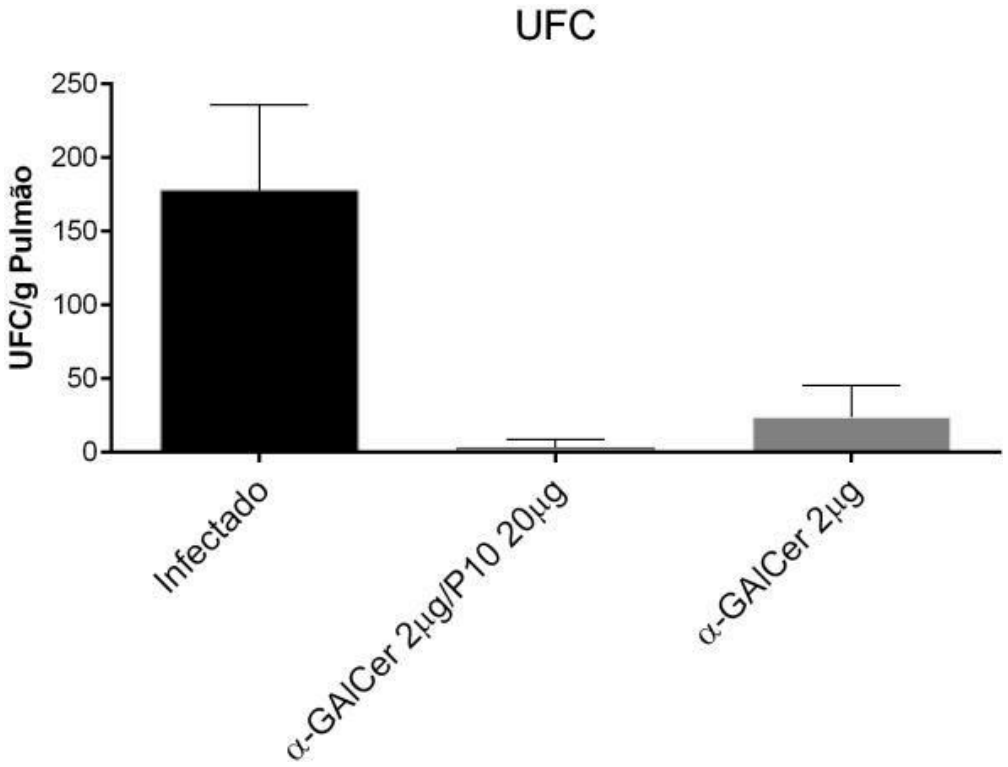
As citocinas do tipo Th1 também foram dosadas nesses intervalos. A citocina IL-12p70 (figura 34) obteve altos níveis apenas no grupo tratado com antifúngico no primeiro intervalo de tempo (52 dias), diminuindo seus níveis em todos os grupos no segundo intervalo de tempo medido (82dpi). A citocina IFN-γ apresentou níveis altos nos dois intervalos de tempo. Em 52 dias após a infecção os grupos infectado, α-GalCer/Bactrin e Bactrin, apresentaram altos níveis quando comparados ao grupo controle não infectado (PBS), com diferença estatística em todos os grupos. No segundo intervalo (82dpi), apenas os grupos, α-GalCer/Bactrin e Bactrin mantiveram os níveis de IFN-γ indicando que produção da citocina foi robusta e de longa duração.

9.4 avaliação da resposta imune provocada pela α-GalCer em camundongos imunossuprimidos e infectados com Pb18

Foi realizado mais um estudo utilizando α-GalCer em modelo de PCM murino, com camundongos BALB/c imunossuprimidos mimetizando o tratamento da PCM em pacientes imunossuprimidos. Os camundongos BALB/c receberam dexametasona na água como descrito no item 4.13, e 21 dias após o início do tratamento com dexametasona, os camundongos foram infectados com Pb18 e 30 dias após a infecção procedeu se o tratamento da PCM com α-GalCer 2µg via intranasal.

Foi verificado a carga fúngica (UFC) nos pulmões dos animais infectados (figura 35), a imunização com α-GalCer, associada ou não ao peptídeo P10, induziu a diminuição do número de células viáveis nos pulmões dos camundongos BALB/c infectados e tratados com α-GalCer sozinha ou associado ao P10 (α-GalCer/P10).

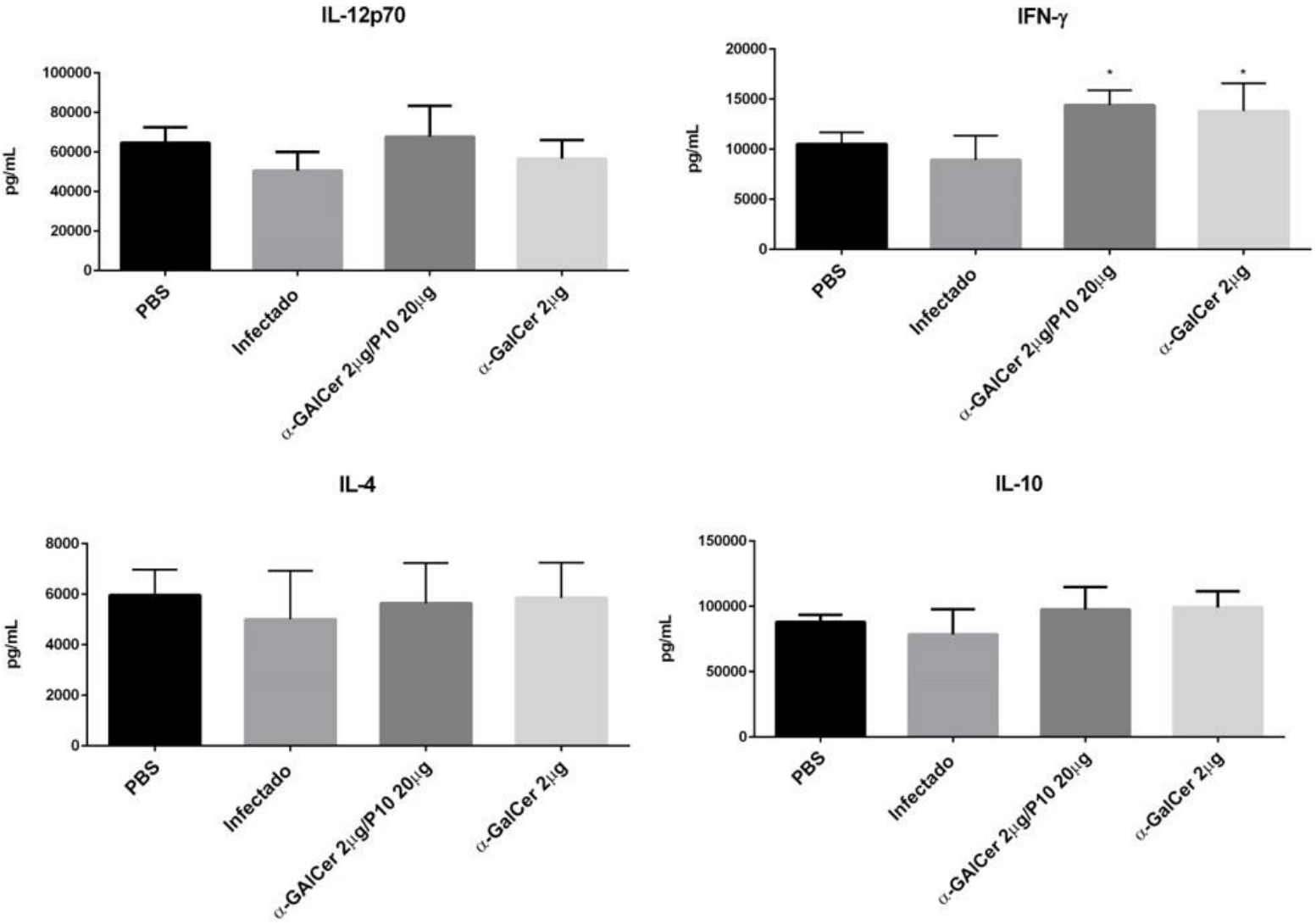
Figura 35:Contagem das UFCs dos pulmões dos camundongos BALB/c imunossuprimido com dexametasona



Foi contado o número de células viáveis (UFC) dos pulmões dos camundongos BALB/c imunossuprimidos com dexametasona, infectados com Pb18 e imunizados com α-GalCer e α-GalCer/P10. Parte do homogenato foi plaqueado e as placas ficaram armazenadas a 37° C, 5% CO2 por 10 a 15 dias e então as UFCs foram contadas e analisadas.

Os níveis de citocinas do tipo Th1 e Th2 foram dosados do homogenato pulmonar dos animais pelo método de ELISA. Como pode ser visualizado na figura 36.

Figura 36: Quantificação das citocinas Th1 e Th2 do homogenato pulmonar dos camundongos BALB/c imunossuprimidos.



A quantificação das citocinas no homogenato pulmonar dos animais BALB/c imunossuprimidos foram analisadas pelo método de ELISA. Foram avaliadas as citocinas IL-4 de resposta tipo Th2, IL-10 (regulatória) e citocinas do tipo Th1 (IL-12 e IFN-γ)

O perfil de citocinas Th1 demonstraram diferenças em seus níveis. A citocina IL-12 mostrou discreto aumento no grupo imunizado com o complexo α-GalCer/P10, mas sem significância estatística. Por outro lado, a citocina IFN-γ teve altos níveis nos grupos tratados com α-GalCer associado ou não ao peptídeo P10. Curiosamente, as citocinas IL-4 e IL-10 não tiveram alterações nos níveis dosados do homogenato em nenhum dos grupos experimentais. A avaliação das citocinas mostraram que a associação do α-GalCer/P10 induzem produção de citocina pró-inflamatória IFN-γ capaz de incitar resposta protetora visto pela diminuição do número de células viáveis.

10. Discussão

As vacinas são consideradas o maior achado na saúde pública desde o século passado (NANJAPPA et al., 2014). A erradicação de algumas doenças infeciosas como varíola, junto a quase erradicação ou o sucesso na prevenção de outras infecções por vírus ou bactérias, contribuíram para o sucesso da vacinação (NANJAPPA et al., 2014). O desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura tem sido o maior obstáculo no controle de agentes infeciosos, como os fungos particularmente, devido à falta de conhecimento do mecanismo que sustenta a imunidade protetora (NANJAPPA et al., 2014).

As doenças fúngicas estão entre as primeiras doenças de etiologia conhecida (SEGAL et al., 2006). As micoses sistêmicas que causam doenças severas, apesar de menos comum, tem aumentado em frequência e importância na medicina moderna (SEGAL et al., 2006). Essa importância tem ascendido amplamente a percepção da necessidade de se investir em ferramentas imunológicas para integrar ou substituir a quimioterapia, e assim minimizar o uso de antimicrobianos (CASSONE, 2008). Além disso, o aumento no interesse em vacinas também está relacionado ás infecções fúngicas sistêmicas em grupos de alto risco: pacientes imunocomprometidos, prematuros, pacientes com câncer e com tratamento invasivo de longa permanência em hospital (IANNITTI et al., 2012; MEDICI et al., 2015; ROY et al., 2012; SPELLBERG, 2011).

O presente trabalho focou na incorporação do peptídeo P10 ao adjuvante, com base em lipídio catiônico, DDA, e a indução da resposta imune provocada por ambos. A utilização de peptídeos na imunização necessita de adjuvantes, pois os peptídeos sozinhos, mesmo com epítopo escolhido para indução de resposta imune desejada, são fracamente imunogênicos (LI et al., 2014; ROTH; WELLER, 2017). O desenvolvimento de adjuvantes e métodos de entregas inovadores são requeridos para alcançar a estimulação de resposta imune apropriada e prolongada (PETROVSKY; AGUILAR, 2004; YANG; KIM, 2015).

Seguindo os trabalhos anteriores do laboratório (MAYORGA et al., 2012), foi utilizado neste estudo o lipídeo catiônico DDA (DODAB), por mostrar que o lipossoma liga se eficientemente a antígenos auxiliando na indução de resposta imune (LINCOPAN et al., 2009a). A habilidade dos lipossomas em induzir resposta imune incorporado ou associado à antígenos foi descrito pela primeira vez na década de 70 (ALLISON; GREGORIADIS, 1974, 1976; SCHWENDENER, 2014), desde então, lipossomas ou nano-vesículas derivadas de lipossomas, tais como arqueossomas e virossomas, têm se

tornado importantes sistemas carreadores; e o interesse por vacinas bas eadas em lipossomas tem crescido (SCHWENDENER, 2014).

A principal vantagem dos lipossomas, arqueossomas, virossomas e sistemas de entregas (baseados em lipossomas em particular), é sua versatilidade e plasticidade (SCHWENDENER, 2014). A composição do lipossoma (lipídios, carga e tamanho) e o método de preparação (sonicação, hidratação), podem ser escolhidos para alcançar as características necessárias (SCHWENDENER, 2014).

Inicialmente foram feitos estudos de associação do lipídio catiônico ao peptídeo P10, para analisar as melhores condições físico-químicas da associação de ambos. Na primeira etapa do estudo a imunização feita com diferentes concentrações de DDA/P10 não induziu resposta imune protetora nos camundongos C57Bl/6 infectados, provavelmente devido à instabilidade da associação entre as estruturas.

O peptídeo P10 possui valor de pI de aproximadamente 9,0; pI ou ponto isoelétrico, é definido pelo pH de uma solução em que a rede de cargas de uma proteína é igual a zero; (NOVÁK; HAVLÍČEK, 2016). O caráter catiônico do peptídeo disperso em solução isotônica de NaCl com pH 7,2 teve instabilidade coloidal, fraca força de repulsão entre as partículas e alta taxa de agregação. A associação do DDA e P10 foi de baixa atração eletrostática e altas taxas de agregação como foi visto nas variações dos valores de Pdi e Dz. Esse efeito foi minimizado com o aumento na concentração do lipídeo catiônico.

O comportamento das estruturas foi avaliado pelo potencial ζ (zeta); termo científico para potencial eletrocinético em sistemas coloidais medido pela carga superficial (GUMUSTAS et al., 2017). Essa característica pode influenciar na estabilidade da partícula, bem como sua captura pelas células apresentadoras de antígeno, e o tráfego intracelular (BUCKTON, 1995). A estabilidade do sistema depende do balanço entre forças opostas: van der Waals e pela dupla camada elétrica da partícula (GUMUSTAS et al., 2017). Quanto maior a carga superficial, melhor a estabilidade coloidal das partículas (GUMUSTAS et al., 2017).

Valores de potencial zeta altamente positivos ou negativos acima de 30 mV levam a monodispersividade; por outro lado, valores menores de carga (5 mV) podem levar a aglomeração das partículas (GUMUSTAS et al., 2017). Além disso, partículas fortemente catiônicas são mais favoráveis à interação com a membrana celular, aumentando suas

chances de captura, porém, podem ser mais tóxicas (GUMUSTAS et al., 2017). O potencial zeta das partículas pode ser alterado pela variação da concentração estabilizadora ou pela modificação superficial com agentes catiônicos (GUMUSTAS et al., 2017).

Para alcançar a estabilidade coloidal do complexo DDA/P10, seria necessário o aumento na concentração de DDA, porém, concentrações superiores 0,5mM do lipídio não são viáveis. Estudos prévios com testes de toxicidade realizados em cultura celular, avaliando concentrações de 0,5mM de DDA, tiveram taxa de mortalidade celular de 50% (CARMONA-RIBEIRO et al., 1997; CARMONA-RIBEIRO, 2017). Os principais obstáculos nas formulações lipossômicas feitas com DDA são as altas concentrações necessárias (1-10mM) e as grandes dimensões da estrutura (tamanho) (CARMONA-RIBEIRO, 2017; DAVIDSEN et al., 2005; TSURUTA et al., 1997).

Por fim, a construção do complexo DDA/P10 não induziu produção de citocinas pró inflamatórias suficientes para a proteção contra a infecção por Pb18. Estudos utilizando o DDA em fragmentos de bicamada (DODAB BF), em baixas concentrações do lipídio (([DODAB])≤0,1 mM) e antígeno (0,001-0,005mg/mL); mostraram que ás combinações adjuvante/antígeno tiveram alta estabilidade química, exibindo baixa, ou mesmo ausência, de citotoxicidade e foram superiores ao Alum pela capacidade de induzir resposta imune celular tipo Th1 (CARMONA-RIBEIRO, 2017; LINCOPAN et al., 2009a).

Devido à instabilidade e baixa imunogenicidade do complexo DDA/P10, os grupos apresentaram extensas lesões granulomatosas nos cortes histológicos, presença de leveduras livres no parênquima pulmonar e altas contagens de células viáveis (UFCs) nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados.

A instabilidade do complexo DDA/P10 direcionou aos estudos com a adição do polímero aniônico CMC (carboximetilcelulose). As moléculas de cargas oposta foram unidas pela interação eletrostática (LbL) (MELO; MAMIZUKA; CARMONA-RIBEIRO, 2010; VIEIRA; CARMONA-RIBEIRO, 2008), ás partículas catiônicas do DDA foram adicionadas ao polímero aniônico (CMC) e consecutivamente o peptídeo P10.

As estruturas de DDA/CMC/P10 selecionadas para a utilização no tratamento da PCM murino apresentaram características físico-químicas estáveis (potencial zeta acima

de 30 mV, Pdi abaixo de 0,5 e Dz abaixo 150 nm) porém, não foram eficientes na indução de resposta imune protetora. O estudo utilizou baixas concentrações dos três componentes do arranjo. As concentrações utilizadas foram baseadas no estudo feito com PSS/DODAB (sulfato de poliestireno aniônico) e Sílica/DODAB com antígeno 18kDa-hsp de *M. leprae* cuja concentração no estudo variou de 0,005 a 0,1 mM de adjuvante, e induziram resposta imune protetora (LINCOPAN et al., 2009b). Nesse estudo, as partículas (PSS e sílica) foram recobertas com DDA e então adicionado o antígeno (LINCOPAN et al., 2009b). As concentrações de CMC foram baseadas no trabalho de MELO et al., 2010, que estudaram esse procedimento (LbL) utilizando DDA/CMC e PDDA (cloreto de poli(dialildimetilamônio)) com resultados positivos na entrega do PDDA e sem toxicidade (MELO et al., 2010).

Em nosso estudo, a imunização com DDA/CMC/P10, não direcionou a produção eficiente da resposta imune protetora contra infecção por Pb18, demonstrado pela contagem de UFCs dos grupos estudado e baixos níveis na produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN-γ e IL-12. Além disso, como mencionado anteriormente, a utilização de DDA (DODAB) necessita de altas concentrações para eficicácia como adjuvante lipossomal (CARMONA-RIBEIRO, 2017; DAVIDSEN et al., 2005; TSURUTA et al., 1997). Seria necessário também, aumentar a concentração do peptídeo, esse fato inviabilizaria o tratamento pois, estudos de PCM murino utilizando o peptídeo P10, mostraram que a concentração ótima para indução da resposta imune protetora foi alcançada com doses de 20µg de peptídeo (TABORDA et al., 1998) ou menores (AMARAL et al., 2010).

Embora o uso do DDA como adjuvante seja bem considerado, graças a sua versatilidade e controle na produção do tamanho e forma; a resposta imune produzida por ele é insuficiente, especialmente contra antígenos fracos (BRANDT et al., 2000; CHRISTENSEN et al., 2011), vários estudos mostraram que o nível, e a qualidade da resposta imune induzida pelos lipossomas de DDA, podem ser extensivamente aumentadas pela incorporação de imunoestimuladores entre eles a TDB (CHRISTENSEN et al., 2011). Diante dessas premissas, estudamos a incorporação da TDB em DDA e analisamos as características morfológicas e físico-químicas e assim, utilizamos o adjuvante junto ao peptídeo P10.

As características estudadas mostraram estabilidade do sistema, com carga superficial positiva (superior a 30 mV), baixa taxa de agregação causada pela repulsão

das cargas positivas e heterodispersão. Estudos com DDA mostraram que a incorporação da trealose ao lipossoma aumenta não só as propriedades imunogênicas deste como também melhoram estabilidade da estrutura. As cadeias behenil ligam-se via éster ao carbono 6 de cada um dos dois anéis glicopiranose formando a cabeça da estrutura. Estes anéis tem capacidade de formarem pontes de hidrogênio com o meio dispersante o que não ocorre com o grupo positivo do DDA (CHRISTENSEN et al., 2011).

A imunização com DDA/TDB/P10 induziu resposta imune celular com perfil de citocinas Th1 especialmente IFN-γ e IL-12, com baixos níveis de citocinas Th2, e aumento na produção de citocinas Th17 (IL-17A e IL-6). A eficiência na apresentação foi confirmada pela diminuição na carga fúngica (UFCs) nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados com Pb18 e pelos granulomas compactos, bem estruturados mostrado na análise histopatológica.

A citocina IFN-γ é importante pois modula vários componentes da resposta imune (KHAN, 2008) conferindo proteção contra uma variedade de infecções fúngicas (ESPINOSA; RIVERA, 2011). Na resposta imune inata ela é produzida principalmente pelas células NK, embora as células apresentadoras de antígenos possam produzi-la também (KHAN, 2008). A IFN-γ atua como ativador de fagócitos mononucleares, aumentando a expressão tanto de MHC de classe I quanto classe II; resultando em maior susceptibilidade ás células T citolíticas para reconhecimento e consequentemente promoção da resposta imune celular (KHAN, 2008). Leva a ativação de iNOS, indução de T-bet e diferenciação de linfócitos Th1 (ESPINOSA; RIVERA, 2011) e pode suprimir alternativamente os padrões de respostas Th2 e Th17 (ESPINOSA; RIVERA, 2011). Na defesa às infecções fúngicas seu papel foi destacado pela susceptibilidade de camundongos IFN-γ-deficientes à infecções com Histoplasma, Cryptococcus, Blastomyces e Candida (ARMSTRONG-JAMES et al., 2010; CHEN et al., 2005; DUPLESSIS et al., 2011; ESPINOSA; RIVERA, 2011; KELLEHER et al., 2006; NAGAI et al., 1995; SHAO et al., 2005; SIDDIQUI et al., 2005; STEVENS; BRUMMER; CLEMONS, 2006).

A citocina IL-12 é primeiramente secretada pelas células dendríticas e agem nas células NK promovendo secreção de IFN-γ; sua função principal é a modulação das células T CD4 naïve para direcionar diferenciação Th1 (ESPINOSA; RIVERA, 2011). Pacientes com desordem genética no receptor IL-12 são mais suscetíveis às infecções

fúngicas por Coccidioides e Paracoccidioides destacando a importância da citocina na imunidade ao fungo (DE MORAES-VASCONCELOS et al., 2005; ESPINOSA; RIVERA, 2011; VINH et al., 2011). Na ausência da produção de IL-12, a secreção de IFN-γ é diminuída e a diferenciação Th1 é prejudicada (ESPINOSA; RIVERA, 2011; MAGRAM et al., 1996; O'GARRA; MURPHY, 2009).

As células T podem também diferenciar se em células Th17, linhagem de células distinta que produz várias citocinas e quimiocinas (LIANG et al., 2006; TRISTÃO et al., 2017; ZAMBRANO-ZARAGOZA et al., 2014). A citocitona IL-17 é sintetizada pelas células NK, células T γδ, neutrófilos e células linfóides inatas durante a resposta imune inata (MCGEACHY; CUA, 2008; TRISTÃO et al., 2017) e pelos linfócitos Th17 durante a resposta adaptativa (TRISTÃO et al., 2017). A citocina IL-17A coordena a inflamação tecidual por meio da expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que coletivamente determinam a magnitude da resposta inflamatória (TRISTÃO et al., 2017).

As infecções fúngicas tem sido associada com indução da resposta imune Th17 com direcionamento de mecanismos efetores, com produção de peptídeos antimicrobianos (FERREIRA et al., 2014b; LIANG et al., 2006; TRISTÃO et al., 2017; ZAMBRANO-ZARAGOZA et al., 2014), fatores importantes para o recrutamento e função dos neutrófilos (LAAN et al., 1999; TRISTÃO et al., 2017; YE et al., 2001) e promoção da resistência à infecção(HERNÁNDEZ-SANTOS; GAFFEN, 2012; PEREZ-NAZARIO et al., 2013; ROMANI, 2011; TRISTÃO et al., 2017).

A citocina IL-6 está envolvida em várias funções imune; pode ser produzida pelas APCs e promover polarização da resposta anti-inflamatória Th2 (ALLEN; WYNN, 2011; DIEHL; RINCÓN, 2002; JIMÉNEZ-URIBE et al., 2019) e induzir resposta Th17 durante o contato com as células T(HEINK et al., 2017; JIMÉNEZ-URIBE et al., 2019). Pode também influenciar a aquisição do fenótipo M2 dos macrófagos(JIMÉNEZ-URIBE et al., 2019; MAUER et al., 2014). Além disso, a citocina IL-6, associada ao padrão Th17, constitui se como uma citocina essencial no desenvolvimento do granuloma sendo importante na resposta protetora durante a infecção (TRISTÃO et al., 2017). Estudos com *P. brasiliensis* demonstraram que a citocina IL-6 aumenta resistência murino contra leveduras (PINA et al., 2013; TRISTÃO et al., 2017); em PCM experimental, a infecção induziu síntese de IL-6 nos estágios iniciais da infecção e isto foi essencial para direcionamento do perfil imune Th17 (TRISTÃO et al., 2017).

No presente estudo, as diferentes concentrações de DDA/TDB foram utilizadas na avaliação da estabilidade adjuvante/peptídeo e indução na produção de citocinas. Nossos resultados mostraram que a imunização com concentrações maiores do adjuvante tiveram baixos níveis na produção de citocinas Th1 (IFN-γ e IL-12) e Th17 (IL-17) e foram coerentes com os estudos de VAN DISSEL et al., 2014, onde a utilização de concentrações média e altas do adjuvante diminuíram a produção de algumas citocinas (VAN DISSEL et al., 2014).

As populações de macrófagos exibem forte plasticidade, que varia de acordo com o estímulo, e microambiente da lesão, podendo ser classificado como tipo M1 ou M2 (PAGLIARI et al., 2018). Durante o curso da infecção a mudança fenotípica de macrófagos M1 para macrófagos M2 está envolvida com a resolução da doença, onde os macrófagos M1 são substituídos por macrófagos M2 por estes serem menos tóxicos e por sua atividade reparadora (JABLONSKI et al., 2015). Os macrófagos M1 estão envolvidos na resistência bacteriana e são ativados via IFN-γ enquanto os macrófagos M2 estão envolvidos no reparo tecidual e são ativados pela citocina IL-4 (JABLONSKI et al., 2015; ORDWAY et al., 2006; PFEFFER et al., 1993).

Os macrófagos internalizam e processam antígenos para apresentar aos linfócitos T através das moléculas MHC classe II (JAKUBZICK; RANDOLPH; HENSON, 2017; JIMÉNEZ-URIBE et al., 2019), entretanto, outros sinais co estimulatórios são requeridos para induzir totalmente a ativação dos linfócitos T. As moléculas CD80 e CD86 são as principais moléculas co estimulatórias expressas na superfície das APCs (JIMÉNEZ-URIBE et al., 2019). A molécula CD86 tem alta afinidade pela molécula CD28 enquanto CD80 tem alta afinidade por CD152 (COLLINS et al., 2002; PALERMO et al., 2012). A molécula CD28 está envolvida na ativação das células T, sinalização para proliferação celular, secreção de IL-2 e sobrevivência celular pelo aumento da expressão de Bcl-2, enquanto CD152 para a ativação celular, favorece a apoptose e induz tanto anergia quanto tolerância (PALERMO et al., 2012).

O resultado do estudo das populações dos pulmões, identificou grande quantidade de macrófagos M1 nos estágios iniciais do tratamento da PCM com DDA/TDB/P10, mostrando que esses macrófagos são essenciais nos estágios iniciais da infecção. Intensidade da população de macrófagos M1 diminuiu ao final do experimento, mostrando possível troca de fénotipo M1 para M2. Porém, quando foi realizada avaliação

da atividade dos macrófagos M2 mostraram que essa célula foi pouco ativa durante todo o tratamento da PCM com DDA/TDB/P10.

A intensidade (MFI) de células CD80 dos macrófagos M2 não mostrou alteração considerável em seus níveis nos intervalos verificados; enquanto que a intensidade de CD86 nos grupos infectados e tratados nos intervalos finais do experimento tiveram intensidade menores estatisticamente que o grupo sham.

Os macrófagos possuem um grau notável de plasticidade funcional, como exemplificado por sua habilidade em rapidamente, e reversivelmente, trocar entre diferentes estados de ativação (DAVIS et al., 2013; EDWARDS et al., 2006; GRATCHEV et al., 2006; PORCHERAY et al., 2005; RAGGI et al., 2017; STOUT et al., 2005; TARIQUE et al., 2015). O desequilíbrio na polarização M1/M2 ou repolarização dos macrófagos residentes é frequentemente associado com várias doenças, e a mistura de fenótipos M1/M2 foi descrita em algumas situações patológicas como câncer, doenças autoimunes ou inflamatórias e infecções crônicas (KHALLOU-LASCHET et al., 2010; PORTA et al., 2009; RAGGI et al., 2017; ZEYDA et al., 2007).

Nossos resultados mostram uma grande quantidade de macrófago duplo positivo foi encontrada nos pulmões dos camundongos C57Bl/6, principalmente nos primeiros estágios da infecção. O estudo da ativação das células M1/M2 mostraram baixa intensidade ou intensidade semelhante ao grupo sham durante todo o experimento, mostrando que as células poderiam não estar ativas. RAGGI et al., 2017 defendem a ideia de que o estado de polarização dos macrófagos não é determinado apenas pelo tipo de estímulo, mas depende também do ambiente tecidual local em que elas se diferenciam (CROWTHER et al., 2001; LAVIN et al., 2014; RAGGI et al., 2017), no nosso estudo o estimulo ou o microambiente podem não ter sido suficiente para ativação e polarização dos perfis M1/M2 ou, no tempo investigado as células poderiam estar desativadas.

As células NK contribuem para a resistência da inata a infecções através de uma variedade de mecanismos incluindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias e imunoregulatórias e quimiocinas, lise das células do hospedeiro infectadas e morte direta das leveduras(LIEBERMAN; MANDELBOIM, 1994; LONGHI et al., 2012; VIVIER et al., 2008). Em PCM, LONGHI et al., 2012; e PERAÇOLI et al., 1991, demonstraram que que as células NK tem atividade citotóxica reduzida em pacientes com a doença (LONGHI et al., 2012; PERAÇOLI et al., 1991). Nossos resultados mostraram que 65

dias após a infecção, a porcentagem de células NK entre o grupo infectado e imunizado com DDA/TDB/P10 foram idênticas e baixas.

Os linfócitos T $CD4^+$ também foram avaliados durante o experimento. Embora o adjuvante DDA/TDB e o peptídeo P10 tenha conhecida capacidade de estimular resposta Th1, como comprovado pelo aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias; não foram encontradas diferenças em seus níveis nos grupos analisados em nenhum dos intervalos verificados. Por outro lado, os linfócitos T $CD8^+$ apresentaram diferenças em seus níveis quando comparados aos linfócitos $CD4^+$ do mesmo grupo.

O estudo realizado com α-GalCer e peptídeo P10 em modelo murino de PCM na linhagem BALB/c, induziu resposta imune protetora com produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatória especialmente IL-12. O glicolipídio α-GalCer tem como propriedade indução rápida na produção de citocinas regulatórias como IL-4, IL-12 e IFN-γ das células NKTs. Estudos utilizando α-GalCer em cultura de células mostraram que as células dendríticas apresentaram eficientemente o glicolipideo às células NKTs produzindo grandes quantidades de IL-12 (FUJII et al., 2002; KADOWAKI et al., 2001; KITAMURA et al., 1999; NISHIMURA et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2000; TROBONJACA et al., 2001; YANG et al., 2000). Em estudo onde α-GalCer foi administrado via intranasal associado ao peptídeo R15K (antígeno de HIV-1); o α-GalCer induziu a atividade dos linfócitos T citotóxicos específicos para o antígeno porém, a produção de IFN-γ peptídeo-específicas das células NKTs não foi significante (COURTNEY et al., 2009).

A associação α-GalCer/Bactrin em estudos de recidiva da PCM em modelo murino não induziram resposta protetora de longo termo. Embora o α-GalCer tenha consideravelmente diminuído o número de células viáveis nos pulmões dos camundongos, sozinho ou associado ao tratamento antifúngico; a proteção induzida pelo glicolipido não foi de longo termo, não evitando as recidivas após o final do tratamento (82dpi).

No modelo de imunossupressão o ensaio mimetizou pacientes com sistema imunológico suprimido (com algum tipo de deficiência no sistema imune, esses pacientes são mais suscetíveis a infecções, entre elas, infecções fúngicas) (MEDICI; DEL POETA, 2015; SPELLBERG, 2011). O tratamento realizado com α-GalCer em camundongos BALB/c imunossuprimidos induziu produção de altos níveis de citocinas pró-

inflamatórias pelas células NKTs principalmente IFN-γ, e levou a diminuição na carga fungica nos pulmões dos camundongos infectados.

A ativação das células NKT tipo 1 produzem um coquetel de moléculas efetoras solúveis (LIAO; ZIMMER; WANG, 2013). Tradicionalmente, essas células (tipo 1) foram definidas por sua habilidade de produzir IL-4 e IFN-γ que influenciam a geração de resposta imune Th1 e Th2 entre outras citocinas de ambos perfis (LIAO; ZIMMER; WANG, 2013). As células NKTs tipo 2 podem secretar citocinas pró-inflamatória e anti-inflamatórias, e compartilham alguma funções imunes com as células tipo 1(LIAO; ZIMMER; WANG, 2013).

O estudo evidenciou a imunogenicidade do peptídeo sintético P10 incorporado ao adjuvante baseado em lipídeo catiônico DDA/TDB. Foi evidenciado que o lipídeo catiônico sozinho, embora seja um ótimo sistema de entrega, tem fraca imunogenicidade. A incorporação da trealose dibehenato ao lipossoma aumentou suas características imunogênicas e sua eficiência na apresentação do peptídeo às células apresentadoras de antígeno, provocando resposta imune celular satisfatória. A imunização com DDA/TDB/P10 embora eficiente, não alterou as populações celulares significativamente, duas questões podem ser levantadas nessa parte do estudo: o painel de marcadores pode não ser o mais indicado nesse tratamento, necessitando de marcadores para M1 e M2 mais eficazes; ou o tempo verificado do experimento não tenha sido o mais indicado.

A utilização do glicolipidio α-GalCer mostou ser um ótimo agonista na resposta imune contra PCM murino. Em todos os ensaios o glicolipidio levou a diminuição no número de células viáveis dos pulmões dos camundongos e induziu produção de citocinas pró-inflamatórias. O glicolipidio auxilio ainda na diminuição da carga fúngica e aumento de citocinas no modelo de imunossupressão dos camundongos, favorecendo seus estudos nesse modelo. Entretanto, a resposta de longo termo não foi alcançada com o uso do glicolipidio; a resposta, embora robusta e protetora, não manteve os níveis de citocinas pró inflamatórias por tempo adequado não evitando as recidivas.

11. Conclusão

O estudo do peptídeo P10 incorporado em lipídio catiônico em modelo murino de PCM levou as seguintes conclusões:

- A imunização via subcutânea do peptídeo P10 associado ao lipídio catiônico nos camundongos C57Bl/6, não produziu resposta imune protetora.

- A incorporação do polímero aniônico CMC ao complexo DDA/P10 aumentou a carga superficial da estrutura e causando melhor estabilidade do coloide, porém não induziu resposta imune protetora suficiente para conter a infecção fúngica.

- A incorporação de trealose dibehenato ao DDA aumentou sua estabilidade e imunogenicidade. O complexo DDA/TDB/P10 modulou resposta imune celular Th1/Th17 que foi capaz de proteger os camundongos contra a infecção fúngica.

- A imunização com DDA/TDB/P10 não induziu aumento na frequência de linfócitos T $CD4^+$ nos intervalos de tempo medido, durante o tratamento da PCM com o DDA/TDB/P10.

- A imunização, via intranasal, com α-GalCer/P10, de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* diminui a carga fúngica nos pulmões dos camundongos, porém não levou a produção de citocinas pró-inflamatórias estatisticamente.

- A imunização com α-GalCer aliada ao tratamento antifúngico sulfamethaxazol/trimethropin foi efetiva em curto prazo, mas não produziu resposta protetora de longa duração não evitou as recidivas 82 dias após a infecção com Pb18.

- A imunização com α-GalCer/P10 em modelo murino de imunossupressão foi capaz de induzir resposta protetora imune com perfil Th1.

Referências bibliográficas

AGGER, E. M. et al. Cationic Liposomes Formulated with Synthetic Mycobacterial Cordfactor (CAF01): A Versatile Adjuvant for Vaccines with Different Immunological Requirements. **PLoS ONE**, v. 3, n. 9, p. e3116, 8 set. 2008.

ALLEN, J. E.; WYNN, T. A. Evolution of Th2 Immunity: A Rapid Repair Response to Tissue Destructive Pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002003, 12 maio 2011.

ALLISON, A. C.; GREGORIADIS, G. Liposomes as immunological adjuvants. **Nature**, v. 252, n. 5480, p. 252–252, nov. 1974.

ALLISON, A. C.; GREGORIADIS, G. Liposomes as immunological adjuvants. **Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer**, n. 56, p. 58–64, 1976.

AMARAL, A. C. et al. Poly(lactic acid-glycolic acid) nanoparticles markedly improve immunological protection provided by peptide P10 against murine paracoccidioidomycosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 5, p. 1126–1132, 2010.

AMARAL, E. P. et al. Pulmonary Infection with Hypervirulent Mycobacteria Reveals a Crucial Role for the P2X7 Receptor in Aggressive Forms of Tuberculosis. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 7, p. e1004188, 3 jul. 2014.

ARMSTRONG-JAMES, D. et al. Exogenous Interferon-γ Immunotherapy for Invasive Fungal Infections in Kidney Transplant Patients. **American Journal of Transplantation**, v. 10, n. 8, p. 1796–1803, 26 mar. 2010.

AWATE, S.; BABIUK, L. A.; MUTWIRI, G. Mechanisms of Action of Adjuvants. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. MAY, p. 1–10, 2013.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245–252, 19 mar. 1998.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238-IN27, 1 ago. 1965.

BARNIER-QUER, C. et al. Adjuvant Effect of Cationic Liposomes for Subunit Influenza Vaccine: Influence of Antigen Loading Method, Cholesterol and Immune Modulators. **Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 392–410, 25 jul. 2013.

BARROS, M. H. M. et al. Macrophage polarisation: An immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–11, 2013.

BATISTA JR, J. et al. Is the geographical origin of a Paracoccidioides brasiliensis isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? **Mycoses**, v. 53, n. 2, p. 176–180, 1 mar. 2010.

BEAMAN, L. Fungicidal activation of murine macrophages by recombinant gamma interferon. **Infection and immunity**, v. 55, n. 12, p. 2951–5, dez. 1987.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F. et al. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 313–318, abr. 2013.

BENDELAC, A. et al. MOUSE CD1-SPECIFIC NK1 T CELLS: Development, Specificity, and Function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, n. 1, p. 535–562, abr. 1997.

BENDELAC, A.; SAVAGE, P. B.; TEYTON, L. The Biology of NKT Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 297–336, abr. 2007.

BIJKER, M. S. et al. Design and development of synthetic peptide vaccines: Past, present and future. **Expert Review of Vaccines**, v. 6, n. 4, p. 591–603, 2007.

BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1177–91, 2013.

BOURGEOIS, C.; KUCHLER, K. Fungal pathogens-a sweet and sour treat for toll-like receptors. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 142, 2012.

BRANDT, L. et al. ESAT-6 subunit vaccination against Mycobacterium tuberculosis. **Infection and immunity**, v. 68, n. 2, p. 791–5, fev. 2000.

BROWN, G. D. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts INNATE ANTIFUNGAL IMMUNITY : THE KEY ROLE OF PHAGOCYTES. **Annual Review of Immunology**, n. 3, p. 1–21, 2012.

BROWN, G. D. et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 19 dez. 2012.

BRUMMER, E. et al. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of Paracoccidioides brasiliensis or Blastomyces dermatitidis. **Journal of immunology**, v. 140, n. 8, p. 2786–2789, 1988.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: An update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89–117, 1993.
BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Antifungal mechanisms of activated murine bronchoalveolar or peritoneal macrophages for Histoplasma capsulatum. **Clinical and experimental immunology**, v. 102, n. 1, p. 65–70, out. 1995.
BUCKTON, G. **Interfacial phenomena in drug delivery and targeting**. [s.l.] Harwood Academic Publishers, 1995.
CALICH, V. L. et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to Paracoccidioides brasiliensis. **British journal of experimental pathology**, v. 66, n. 5, p. 585–94, out. 1985.
CALICH, V. L. G.; MHSL;, B. **Fungal Immunology**. Boston, MA: Springer US, 2005.
CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L.; RUSSO, M. Immunogenetics in Paracoccidioidomycosis. In: FRANCO M, LACAZ CS, RESTREPO A, DEL N. G. (Ed.). . **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 151–73.
CALVI, S. A et al. Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 5, n. 15, p. 1373–1379, 2003.
CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. Paracoccidioides Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.
CANO, L. E. et al. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of Paracoccidioides brasiliensis conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. **Infection and immunity**, v. 62, n. 4, p. 1494–6, abr. 1994.
CANO, L. E. et al. Protective Role of Gamma Interferon in Experimental Pulmonary Paracoccidioidomycosis Protective Role of Gamma Interferon in Experimental Pulmonary Paracoccidioidomycosis. v. 66, n. 2, p. 800–806, 1998.
CARMONA-RIBEIRO, A. M. et al. Interactions between Cationic Vesicles and Cultured Mammalian Cells. **Langmuir**, v. 13, n. 8, p. 2215–2218, 1997.
CARMONA-RIBEIRO, A. M. The Versatile Dioctadecyldimethylammonium Bromide. In: **Application and Characterization of Surfactants**. [s.l.] InTech, 2017.
CARNEIRO, C. et al. DODAB:monoolein liposomes containing Candida albicans cell wall surface proteins: a novel adjuvant and delivery system. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 89, p. 190–200, jan. 2015.
CASSONE, A. Fungal vaccines: real progress from real challenges. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 114–124, fev. 2008.
CHAN, Y. R. et al. Lipocalin 2 Is Required for Pulmonary Host Defense against Klebsiella Infection. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 8, p. 4947–4956, 15 abr. 2009.
CHEN, G.-H. et al. The Gamma Interferon Receptor Is Required for the Protective Pulmonary Inflammatory Response to Cryptococcus neoformans. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1788–1796, 1 mar. 2005.
CHRISTENSEN, D. et al. Syringe Free Vaccination with CAF01 Adjuvated Ag85B-ESAT-6 in Bioneedles Provides Strong and Prolonged Protection Against Tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. e15043, 29 nov. 2010.
CHRISTENSEN, D. et al. Cationic liposomes as vaccine adjuvants. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 4, p. 513–521, 2011.
CHRISTENSEN, D. Development and Evaluation of CAF01. In: **Immunopotentiators in Modern Vaccines**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 333–345.
CISALPINO, P. S. et al. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of Paracoccidioides brasiliensis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 8, p. 4553–4560, 1996.
COLLINS, A. V et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. **Immunity**, v. 17, n. 2, p. 201–10, ago. 2002.
COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycology**, v. 49, n. 8, p. 1–14, 4 maio 2011.
COURTNEY, A. N. et al. Alpha-galactosylceramide is an effective mucosal adjuvant for repeated intranasal or oral delivery of HIV peptide antigens. **Vaccine**, v. 27, n. 25–26, p. 3335–3341, 26 maio 2009.
COX, J. C.; COULTER, A. R. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v. 15, n. 3, p. 248–56, fev. 1997.
CROWTHER, M. et al. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. **Journal of leukocyte biology**, v. 70, n. 4, p. 478–90, out. 2001.
DAVIDSEN, J. et al. Characterization of cationic liposomes based on dimethyldioctadecylammonium and synthetic cord factor from M. tuberculosis (trehalose 6,6′- dibehenate) - A novel adjuvant inducing both

strong CMI and antibody responses. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1718, n. 1–2, p. 22–31, 2005.
DAVIS, M. J. et al. Macrophage M1/M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in Cytokine Microenvironments in Cryptococcus neoformans Infection. **mBio**, v. 4, n. 3, 18 jun. 2013.
DE CAMARGO, Z. et al. Production of Paracoccidioides brasiliensis exoantigens for immunodiffusion tests. **Journal of clinical microbiology**, v. 26, n. 10, p. 2147–51, out. 1988.
DE CASTRO, L. F. et al. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **Journal of Infection**, v. 67, n. 5, p. 470–485, 2013.
DE MORAES-VASCONCELOS, D. et al. Paracoccidioides brasiliensis Disseminated Disease in a Patient with Inherited Deficiency in the 1 Subunit of the Interleukin (IL)-12/IL-23 Receptor. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 4, p. 31–37, 15 ago. 2005.
DESEL, C. et al. The Mincle-Activating Adjuvant TDB Induces MyD88-Dependent Th1 and Th17 Responses through IL-1R Signaling. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53531, 7 jan. 2013.
DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Molecular immunology**, v. 39, n. 9, p. 531–6, dez. 2002.
DRUMMOND, R. A. et al. Innate Defense against Fungal Pathogens. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 6, p. a019620–a019620, 1 jun. 2015.
DUPLESSIS, C. A. et al. Two cases illustrating successful adjunctive interferon-γ immunotherapy in refractory disseminated coccidioidomycosis. **The Journal of infection**, v. 63, n. 3, p. 223–8, set. 2011.
EDHOLM, E.; RHOO, K. H.; ROBERT, J. **Macrophages**. Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 62
EDWARDS, J. P. et al. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 6, p. 1298–1307, dez. 2006.
ESPINOSA, V.; RIVERA, A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. 2011.
FABRIS, L. R. et al. DECREASING PREVALENCE OF THE ACUTE/SUBACUTE CLINICAL FORM OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS IN MATO GROSSO DO SUL STATE, BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 2, p. 121–125, abr. 2014.
FEITOSA, E.; BARRELEIRO, P. C. A.; OLOFSSON, G. Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 105, n. 2, p. 201–213, 2000.
FERREIRA, M. C. et al. Interleukin-17-Induced Protein Lipocalin 2 Is Dispensable for Immunity to Oral Candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1030–1035, mar. 2014a.
FERREIRA, M. C. et al. Interleukin-17-Induced Protein Lipocalin 2 Is Dispensable for Immunity to Oral Candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1030–1035, mar. 2014b.
FERREIRA, M. S. Paracoccidioidomycosis. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 10, n. 4, p. 161–165, 2009.
FORTES, M. R. P. et al. Imunologia da paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 516–524, 2011a.
FORTES, M. R. P. et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 516–525, 2011b.
FOTOUHI, F. et al. Adjuvant use of the NKT cell agonist alpha-galactosylceramide leads to enhancement of M2-based DNA vaccine immunogenicity and protective immunity against influenza A virus. **Archives of Virology**, v. 162, n. 5, p. 1251–1260, 24 maio 2017.
FROMTLING, R. A.; SHADOMY, H. J. An overview of macrophage-fungal interactions. **Mycopathologia**, v. 93, n. 2, p. 77–93, fev. 1986.
FUJII, S. et al. Prolonged IFN-γ–producing NKT response induced with α-galactosylceramide–loaded DCs. **Nature Immunology**, v. 3, n. 9, p. 867–874, 5 set. 2002.
GEGEMBAUER, G. et al. Serology of Paracoccidioidomycosis Due to Paracoccidioides lutzii. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2986, 17 jul. 2014.
GONZALEZ, A. et al. Short report: Inhibition by tumor necrosis factor-alpha-activated macrophages of the transition of Paracoccidioides brasiliensis conidia to yeast cells through a mechanism independent of nitric oxide. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, n. 6, p. 828–30, dez. 2004.
GRAEBER, K. E.; OLSEN, N. J. Th17 cell cytokine secretion profile in host defense and autoimmunity. **Inflammation Research**, v. 61, n. 2, p. 87–96, 25 fev. 2012.
GRATCHEV, A. et al. Mφ1 and Mφ2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. **Immunobiology**, v. 211, n. 6–8, p. 473–486, set. 2006.
GUMUSTAS, M. et al. Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. **Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics**, p. 67–108, 1 jan. 2017.

GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **5**, p. 505–517, 2007.
HAHN, R. C. et al. Clinical and epidemiological features of paracoccidioidomycosis due to Paracoccidioides lutzii. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 6, p. e0007437, 4 jun. 2019.
HANSEN, J. et al. Liposome Delivery of Chlamydia muridarum Major Outer Membrane Protein Primes a Th1 Response That Protects against Genital Chlamydial Infection in a Mouse Model1 . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 5, p. 758–767, 2008.
HEINK, S. et al. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. **Nature Immunology**, v. 18, n. 1, p. 74–85, 28 jan. 2017.
HENRIKSEN-LACEY, M. et al. Liposomal vaccine delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n. 4, p. 505–519, 2011.
HERNÁNDEZ-SANTOS, N.; GAFFEN, S. L. Th17 cells in immunity to Candida albicans. **Cell host & microbe**, v. 11, n. 5, p. 425–35, 17 maio 2012.
HILGERS, L. A. T. et al. Combinations of two synthetic adjuvants: Synergistic effects of a surfactant and a polyanion on the humoral immune response. **Cellular Immunology**, v. 92, n. 2, p. 203–209, 1 maio 1985.
HOHL, T. M. et al. Inflammatory Monocytes Facilitate Adaptive CD4 T Cell Responses during Respiratory Fungal Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 6, n. 5, p. 470–481, 19 nov. 2009.
HOLANDA, R. A. et al. Recombinant vaccines of a CD4+T-cell epitope promote efficient control of Paracoccidioides brasiliensis burden by restraining primary organ infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1–20, 2017.
HOLTEN-ANDERSEN, L. et al. Combination of the cationic surfactant dimethyl dioctadecyl ammonium bromide and synthetic mycobacterial cord factor as an efficient adjuvant for tuberculosis subunit vaccines. **Infection and immunity**, v. 72, n. 3, p. 1608–17, mar. 2004.
HUNTER, R. L. et al. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 36, n. 4, p. 371–86, 2006a.
HUNTER, R. L. et al. Trehalose 6,6′-Dimycolate and Lipid in the Pathogenesis of Caseating Granulomas of Tuberculosis in Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 168, n. 4, p. 1249–1261, abr. 2006b.
HUNTER, R. L.; VENKATAPRASAD, N.; OLSEN, M. R. The role of trehalose dimycolate (cord factor) on morphology of virulent M. tuberculosis in vitro. **Tuberculosis**, v. 86, n. 5, p. 349–356, set. 2006.
HUSSAIN, M. J. et al. Th1 immune responses can be modulated by varying dimethyldioctadecylammonium and distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine content in liposomal adjuvants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 358–366, 2014.
IANNITTI, R. G.; CARVALHO, A.; ROMANI, L. From memory to antifungal vaccine design. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 9, p. 467–474, set. 2012.
ISRAELACHVILI, J. N.; MARCELJA, S.; HORN, R. G. Physical principles of membrane organization. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 13, n. 2, p. 121–200, maio 1980.
ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 514, 17 out. 2014.
JABLONSKI, K. A. et al. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0145342, 23 dez. 2015.
JAKUBZICK, C. V.; RANDOLPH, G. J.; HENSON, P. M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 6, p. 349–362, 24 jun. 2017.
JIANG, S. Immunity against Fungal Infections. **Immunology and Immunogenetics Insights**, v. 8, p. III.S38707, 10 jan. 2016.
JIMÉNEZ-URIBE, A. P. et al. CD80 Expression Correlates with IL-6 Production in THP-1-Like Macrophages Costimulated with LPS and Dialyzable Leukocyte Extract (Transferon®). **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p. 1–9, 10 abr. 2019.
KADOWAKI, N. et al. Distinct Cytokine Profiles of Neonatal Natural Killer T Cells after Expansion with Subsets of Dendritic Cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 10, p. 1221–1226, 21 maio 2001.
KARMALI, P. P.; CHAUDHURI, A. Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: Resolved issues, open questions, and future promises. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n. 5, p. 696–722, set. 2007.
KELLEHER, P. et al. Interferon- therapy in two patients with progressive chronic pulmonary aspergillosis. **European Respiratory Journal**, v. 27, n. 6, p. 1307–1310, 1 jun. 2006.
KHALLOU-LASCHET, J. et al. Macrophage Plasticity in Experimental Atherosclerosis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8852, 25 jan. 2010.
KHAN, M. M. Role of Cytokines. In: **Immunopharmacology**. Boston, MA: Springer US, 2008. p. 33–59.
KITAMURA, H. et al. The Natural Killer T (NKT) Cell Ligand α-Galactosylceramide Demonstrates Its Immunopotentiating Effect by Inducing Interleukin (IL)-12 Production by Dendritic Cells and IL-12

Receptor Expression on NKT Cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 7, p. 1121–1128, 5 abr. 1999.
KOLLS DEAN SHEPPARD, K. et al. Regulated by the Gut Microbiome Pulmonary Th17 Antifungal Immunity Is Downloaded from. **J Immunol The Journal of Immunology by guest on**, v. 197, p. 97–107, 2017.
KONNO, F. T. C. et al. Paracoccidioides brasiliensis GP43-derived peptides are potent modulators of local and systemic inflammatory response. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 6, p. 517–527, 2012.
KRONENBERG, M.; GAPIN, L. The unconventional lifestyle of NKT cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 8, p. 557–568, ago. 2002.
LAAN, M. et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 4, p. 2347–52, 15 fev. 1999.
LANTZ, O.; BENDELAC, A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 3, p. 1097–106, 1 set. 1994.
LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 307–21, jul. 1998.
LAVIN, Y. et al. Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1312–1326, 4 dez. 2014.
LEMIÈRE, J.; CARVALHO, K.; SYKES, C. Cell-sized liposomes that mimic cell motility and the cell cortex. In: **Methods in cell biology**. [s.l: s.n.]. v. 128p. 271–285.
LI, W. et al. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. **Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 515–536, 2014.
LIANG, S. C. et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 10, p. 2271–2279, 2 out. 2006.
LIAO, C.-M.; ZIMMER, M. I.; WANG, C.-R. The Functions of Type I and Type II Natural Killer T (NKT) Cells in Inflammatory Bowel Diseases. **Inflamm Bowel Dis**, v. 19, n. 6, p. 1330–1338, 2013.
LIEBERMAN, N.; MANDELBOIM, O. the Role of Nk Cells in Innate. p. 137–145, 1994.
LIN, S. Y. H.; CHENG, C. W.; SU, E. C. Y. Prediction of B-cell epitopes using evolutionary information and propensity scales. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. Suppl 2, p. S10, 2013.
LINCOPAN, N. et al. Novel immunoadjuvants based on cationic lipid: Preparation, characterization and activity in vivo. **Vaccine**, v. 27, n. 42, p. 5760–5771, 2009a.
LINCOPAN, N. et al. Silica-based cationic bilayers as immunoadjuvants. v. 19, p. 1–19, 2009b.
LINDENSTROM, T. et al. Tuberculosis Subunit Vaccination Provides Long-Term Protective Immunity Characterized by Multifunctional CD4 Memory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 12, p. 8047–8055, 2009.
LIONAKIS, M. S.; ILIEV, I. D.; HOHL, T. M. Immunity against fungi. **JCI Insight**, v. 2, n. 11, p. 1–17, 2017.
LONGHI, L. N. et al. Phenotypic and functional characterization of NK cells in human immune response against the dimorphic fungus Paracoccidioides brasiliensis. **J Immunol**, v. 189, n. 2, p. 935–945, 2012.
LOURES, F. V. et al. Paracoccidioides brasiliensis lipids modulate macrophage activity via Toll-dependent or independent mechanisms. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 58–70, out. 2012.
MACHADO, G. C. et al. Cryptic species of Paracoccidioides brasiliensis: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 637–643, ago. 2013.
MAGRAM, J. et al. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. **Immunity**, v. 4, n. 5, p. 471–81, maio 1996.
MARQUES, A. F. et al. 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.
MARQUES DA SILVA, S. H. et al. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3675–80, ago. 2003.
MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 610–615, 2012.
MATSUDA, H. et al. α-Galactosylceramide, a Ligand of Natural Killer T Cells, Inhibits Allergic Airway Inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 22–31, jul. 2005.
MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus Paracoccidioides brasiliensis as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, 2006.
MAUER, J. et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. **Nature Immunology**, v. 15, n. 5, p. 423–430, 30 maio 2014.

MAYORGA, O. et al. The role of adjuvants in therapeutic protection against paracoccidioidomycosis after immunization with the P10 peptide. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. MAY, p. 1–6, 2012.
MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 445–453, abr. 2008.
MEDICI, N. P.; DEL POETA, M. New insights on the development of fungal vaccines: from immunity to recent challenges. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 966–973, 24 nov. 2015.
MELO, L. D.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Antimicrobial Particles from Cationic Lipid and Polyelectrolytes. **Langmuir**, v. 26, n. 14, p. 12300–12306, 20 jul. 2010.
MENCACCI, A. et al. Endogenous interleukin 4 is required for development of protective CD4+ T helper type 1 cell responses to Candida albicans. **The Journal of experimental medicine**, v. 187, n. 3, p. 307–17, 2 fev. 1998.
MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 224–282, 31 out. 2017.
MOURITSEN, O. G. Lipids, curvature, and nano-medicine. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 10, p. 1174–1187, out. 2011.
MUÑOZ, J. E. et al. Immunization with P10 Peptide Increases Specific Immunity and Protects Immunosuppressed BALB/c Mice Infected with Virulent Yeasts of Paracoccidioides brasiliensis. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 177–188, 19 out. 2014.
NAGAI, H. et al. Interferon- and Tumor Necrosis Factor- Protect Mice from Invasive Aspergillosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1554–1560, 1 dez. 1995.
NANJAPPA, S. G.; KLEIN, B. S. Vaccine immunity against fungal infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 28, n. 1, p. 27–33, jun. 2014.
NEGRONI, R. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis, Lutz'S Mycosis). **International Journal of Dermatology**, v. 32, n. 12, p. 847–859, 1993.
NETTO, C. F. et al. [The polysaccharidic antigen from Paracoccidioides brasiliensis. Study of the time of cultivation necessary for the preparation of the antigen]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 11, n. 3, p. 177–81, 1969.
NISHIMURA, T. et al. The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **International Immunology**, v. 12, n. 7, p. 987–994, jul. 2000.
NORDLY, P. et al. Immunity by formulation design: Induction of high CD8+ T-cell responses by poly(I:C) incorporated into the CAF01 adjuvant via a double emulsion method. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 3, p. 307–317, 30 mar. 2011.
NOVÁK, P.; HAVLÍČEK, V. Protein Extraction and Precipitation. In: **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 51–62.
NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Paracoccidioidomycosis. **Current Fungal Infection Reports**, v. 3, n. 1, p. 15–20, 14 mar. 2009.
O'GARRA, A.; MURPHY, K. M. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce TH1 development. **Nature Immunology**, v. 10, n. 9, p. 929–932, set. 2009.
OLSEN, A. W. et al. Protection against chlamydia promoted by a subunit vaccine (CTH1) compared with a primary intranasal infection in a mouse genital challenge model. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, 2010.
ORDWAY, D. et al. Enhanced Macrophage Activity in Granulomatous Lesions of Immune Mice Challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 8, p. 4931–4939, 15 abr. 2006.
PAGLIARI, C. et al. Paracoccidioidomycosis: characterization of subpopulations of macrophages and cytokines in human mucosal lesions. **Medical Mycology**, p. 1–7, 9 nov. 2018.
PALERMO, M. DE L. et al. Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. suppl 1, p. 167–173, dez. 2012.
PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10938–10966, 2015.
PERAÇOLI, M. T. et al. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 29, n. 6, p. 373–380, 1991.
PEREZ-NAZARIO, N. et al. Selective ablation of lung epithelial IKK2 impairs pulmonary Th17 responses and delays the clearance of Pneumocystis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 191, n. 9, p. 4720–30, 1 nov. 2013.
PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. **Immunology and Cell Biology**, v. 82, n. 5, p. 488–496, out. 2004.
PFEFFER, K. et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic

shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. **Cell**, v. 73, n. 3, p. 457–67, 7 maio 1993.
PINA, A. et al. Myeloid Dendritic Cells (DCs) of Mice Susceptible to Paracoccidioidomycosis Suppress T Cell Responses whereas Myeloid and Plasmacytoid DCs from Resistant Mice Induce Effector and Regulatory T Cells. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 4, p. 1064–1077, abr. 2013.
PINA, A.; BERNARDINO, S.; CALICH, V. L. G. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial Paracoccidioides brasiliensis infection. **Journal of leukocyte biology**, v. 83, n. 5, p. 1088–99, 2008.
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, n. 1–2, p. 87–94, 2002.
PORCHERAY, F. et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 0, n. 0, p. 051006055454001, 6 out. 2005.
PORTA, C. et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor B. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 35, p. 14978–14983, 1 set. 2009.
PUCCIA, R. et al. Exocellular components of Paracoccidioides brasiliensis: identification of a specific antigen. **Infection and immunity**, v. 53, n. 1, p. 199–206, jul. 1986.
QUAH, B. J. C.; WARREN, H. S.; PARISH, C. R. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2049–2056, 1 set. 2007.
QUEIROZ-TELLES, F.; ESCUISSATO, D. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 32, n. 6, p. 764–774, 2011.
QUEIROZ JÚNIOR, L. DE P. et al. Serological and antigenic profiles of clinical isolates of *Paracoccidioides* spp. from Central Western Brazil. **Mycoses**, v. 57, n. 8, p. 466–472, ago. 2014.
RAGGI, F. et al. Regulation of Human Macrophage M1–M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1097, 7 set. 2017.
RAMON, G. Sur la toxine et sur I'anatoxine diphtheriques. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 38, p. 1–10, 1924.
RESTREPO, A. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, v. 29, n. 2, p. 182–97, 2008.
ROMANI, L. Cell mediated immunity to fungi: A reassessment. **Medical Mycology**, v. 46, n. 6, p. 515–529, 2008.
ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275–288, 2011.
ROMERO, A. C.; HERNÁNDEZ, E. G. O.; CERÓN, T. F. World ' s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher The Exogenous Antioxidants. [s.d.].
ROSENKRANDS, I. et al. Enhanced humoral and cell-mediated immune responses after immunization with trivalent influenza vaccine adjuvanted with cationic liposomes. **Vaccine**, v. 29, n. 37, p. 6283–6291, 2011.
ROTH, P.; WELLER, M. Peptide-Specific Vaccines. In: **Translational Immunotherapy of Brain Tumors**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 213–226.
ROY, R. M.; KLEIN, B. S. Dendritic Cells in Antifungal Immunity and Vaccine Design. **Cell Host & Microbe**, v. 11, n. 5, p. 436–446, 17 maio 2012.
SAKURAI, T. et al. Lethal toxicity and adjuvant activities of synthetic TDM and its related compounds in mice. **Vaccine**, v. 7, n. 3, p. 269–274, 1 jun. 1989.
SALAZAR, F.; BROWN, G. D. Antifungal Innate Immunity: A Perspective from the Last 10 Years. **Journal of Innate Immunity**, p. 1–25, 2018.
SCHMIDT, S.; TRAMSEN, L.; LEHRNBECHER, T. Natural killer cells in antifungal immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, p. 1–10, 2017.
SCHWENDENER, R. A. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. **Therapeutic Advances in Vaccines**, v. 2, n. 6, p. 159–182, 11 nov. 2014.
SEGAL, E.; ELAD, D. Fungal vaccines and immunotherapy. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 16, n. 3, p. 134–151, set. 2006.
SERCOMBE, L. et al. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 286, 1 dez. 2015.
SESARDIC, D. Synthetic peptide vaccines. **Journal of Medical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 241–242, 1993.
SHAO, C. et al. Transient overexpression of gamma interferon promotes Aspergillus clearance in invasive pulmonary aspergillosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 142, n. 2, p. 233–241, nov. 2005.
SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, 2006.
SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis Treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. suppl 19, p. 31–37, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715–740, 12 jul. 2017.

SIDDIQUI, A. A. et al. IFN-γ at the Site of Infection Determines Rate of Clearance of Infection in Cryptococcal Meningitis. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 3, p. 1746–1750, 1 fev. 2005.

SINGER-VERMES, L. M. et al. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven Paracoccidioides brasiliensis isolates in susceptible inbred mice. **Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 27, n. 2, p. 71–82, 1989.

SINGER-VERMES, L. M. et al. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of Paracoccidioides brasiliensis. **Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 30, n. 3, p. 261–4, 1992.

SMITH KORSHOLM, K. et al. The adjuvant mechanism of cationic dimethyldioctadecylammonium liposomes. **Immunology**, v. 121, n. 2, p. 216–226, 2007.

SPELLBERG, B. Vaccines for invasive fungal infections. **F1000 Medicine Reports**, v. 3, p. 13, 1 jul. 2011.

STEINMAN, R. M.; POPE, M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 12, p. 1519–26, jun. 2002.

STEVENS, D. A.; BRUMMER, E.; CLEMONS, K. V. Interferon-γ as an Antifungal. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. s1, p. S33–S37, 15 set. 2006.

STOUT, R. D. et al. Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 1, p. 342–349, 1 jul. 2005.

SUGAR, A. M. et al. Interactions between human bronchoalveolar macrophages and Blastomyces dermatitidis conidia: demonstration of fungicidal and fungistatic effects. **The Journal of infectious diseases**, v. 171, n. 6, p. 1559–62, jun. 1995.

SULLIVAN, B. A.; KRONENBERG, M. Activation or anergy: NKT cells are stunned by α-galactosylceramide. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 9, p. 2328–2329, 2005.

TABORDA, C. P. et al. 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.

TAKAHASHI, T. et al. **Analysis of Human V24 CD4 NKT Cells Activated by-Glycosylceramide-Pulsed Monocyte-Derived Dendritic CellsThe Journal of Immunology**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.326.1809&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 24 jun. 2019.

TANIGUCHI, M. et al. T <scp>HE</scp> R <scp>EGULATORY</scp> R <scp>OLE OF</scp> Vα14 NKT C <scp>ELLS IN</scp> I <scp>NNATE AND</scp> A <scp>CQUIRED</scp> I <scp>MMUNE</scp> R <scp>ESPONSE</scp>. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 483–513, abr. 2003.

TARIQUE, A. A. et al. Phenotypic, Functional, and Plasticity Features of Classical and Alternatively Activated Human Macrophages. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 53, n. 5, p. 676–688, nov. 2015.

TEIXEIRA, M. DE M. et al. Molecular and Morphological Data Support the Existence of a Sexual Cycle in Species of the Genus Paracoccidioides. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 3, p. 380–389, mar. 2013.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 273–283, ago. 2009.

TEIXEIRA, M. M. et al. Paracoccidioides Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 30 out. 2014.

THEODORO, R. C. et al. Genus Paracoccidioides: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

TRAVASSOS, L. R. et al. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 341–352, 2008.

Trial on the safety of a New Liposomal Adjuvant System CAF01, When Given With the Tuberculosis Subunit Vaccine Ag85B-ESAT-6 as Two Injections With Two Months Interval to Healthy Adult Volunteers. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00922363>.

TRISTÃO, F. S. M. et al. Th17-Inducing Cytokines IL-6 and IL-23 Are Crucial for Granuloma Formation during Experimental Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. AUG, p. 949, 21 ago. 2017.

TROBONJACA, Z. et al. Activating immunity in the liver. I. Liver dendritic cells (but not hepatocytes) are potent activators of IFN-gamma release by liver NKT cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. :**

1950), v. 167, n. 3, p. 1413–22, 1 ago. 2001.
TSURUTA, L. R. et al. Interactions between cationic liposomes and an antigenic protein: the physical chemistry of the immunoadjuvant action. **Journal of lipid research**, v. 38, n. 10, p. 2003–11, out. 1997.
TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen Paracoccidioides. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p. 9–25, set. 2017.
V, D.; AN, K. Liposomal Drug Delivery System-A Review. **Rajiv Gandhi University of Health Sciences Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 47–56, 25 ago. 2014.
VAN DISSEL, J. T. et al. A novel liposomal adjuvant system, CAF01, promotes long-lived Mycobacterium tuberculosis-specific T-cell responses in human. **Vaccine**, v. 32, n. 52, p. 7098–7107, 2014.
VERMA, A. et al. Adaptive Immunity to Fungi. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 3, p. a019612–a019612, 1 mar. 2015.
VIEIRA, D. B.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Synthetic bilayer fragments for solubilization of amphotericin B. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 244, n. 2, p. 427–431, 2001.
VIEIRA, D. B.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Cationic nanoparticles for delivery of amphotericin B: preparation, characterization and activity in vitro. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 6, n. 1, p. 6, 7 maio 2008.
VINH, D. C. et al. Interleukin-12 receptor β1 deficiency predisposing to disseminated Coccidioidomycosis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52, n. 4, p. e99–e102, 15 fev. 2011.
VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. **Nature immunology**, v. 9, n. 5, p. 503–510, 2008.
WANG, N.; WU, T.; WANG, T. Liposomes Used as a Vaccine Adjuvant-Delivery System. **Liposomes**, 2017.
WERNINGHAUS, K. et al. Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit *Mycobacterium tuberculosis* vaccination requires FcRγ–Syk–Card9–dependent innate immune activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 1, p. 89–97, 16 jan. 2009.
WÜTHRICH, M.; DEEPE, G. S.; KLEIN, B. Adaptive Immunity to Fungi. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 115–148, 23 abr. 2012.
YANG, H.; KIM, D. S. Peptide Immunotherapy in Vaccine Development. In: **Advances in protein chemistry and structural biology**. [s.l: s.n.]. v. 99p. 1–14.
YANG, O. O. et al. CD1d on myeloid dendritic cells stimulates cytokine secretion from and cytolytic activity of V alpha 24J alpha Q T cells: a feedback mechanism for immune regulation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 7, p. 3756–62, 1 out. 2000.
YE, P. et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **The Journal of experimental medicine**, v. 194, n. 4, p. 519–27, 20 ago. 2001.
YU, H. et al. Chlamydia muridarum T-Cell Antigens Formulated with the Adjuvant DDA/TDB Induce Immunity against Infection That Correlates with a High Frequency of Gamma Interferon (IFN-)/Tumor Necrosis Factor Alpha and IFN- /Interleukin-17 Double-Positive CD4+ T Cells. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 2272–2282, 1 maio 2010.
ZAMBRANO-ZARAGOZA, J. F. et al. Th17 Cells in Autoimmune and Infectious Diseases. **International Journal of Inflammation**, v. 2014, p. 1–12, 2014.
ZEYDA, M. et al. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. **International Journal of Obesity**, v. 31, n. 9, p. 1420–1428, 26 set. 2007.
ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 445–489, mar. 2010.
ZÚÑIGA, L. A. et al. Th17 cell development: from the cradle to the grave. **Immunological Reviews**, v. 252, n. 1, p. 78–88, mar. 2013.
ZYLBERBERG, C.; MATOSEVIC, S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3319–3329, 21 nov. 2016.