LUCAS DOS SANTOS DIAS

Envolvimento dos neutrófilos na modulação da resposta imune em camundongos BALB/c vacinados com o peptídeo P10 na paracoccidioidomicose experimental

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
2017

LUCAS DOS SANTOS DIAS

Envolvimento dos neutrófilos na modulação da resposta imune em camundongos BALB/c vacinados com o peptídeo P10 na paracoccidioidomicose experimental

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: Carlos Pelleschi Taborda

Versão original

São Paulo
2017

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)

dos Santos Dias, Lucas
Envolvimento dos neutrófilos na modulação da resposta imune em camundongos BALB/c vacinados com o peptídeo P10 na paracoccidioidomicose experimental / Lucas dos Santos Dias; orientador Carlos Pelleschi Taborda. -- São Paulo, 2017.
100 p.

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

1. Neutrófilos. 2. Vacina. 3. Paracoccidioidomicose. 4. P10. 5. Paracoccidioides brasiliensis. I. Pelleschi Taborda, Carlos, orientador. II. Título.

Candidato: Lucas dos Santos Dias

Título da Tese: Envolvimento dos neutrófilos na modulação da resposta imune em camundongos BALB/c vacinados com o peptídeo P10 durante a paracoccidioidomicose experimental.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

A comissão julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a...../...../....., considerou

( )Aprovado ( )Reprovado

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

Nome:.....

Instituição:.....

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 **044** nas fls. **127** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Carlos Pelleschi Taborda**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Ativação e papel dos neutrófilos na modulação da resposta imune em camundongos vacinados com o peptídeo P10, derivado da glicoproteína de 43Da de Paracoccidioides brasiliensis, durante a infecção aguda/crônica na paracoccidioidomicose experimetnal"* do qual participam o(s) alunos(s) **Lucas dos Santos Dias, Julian Esteban Muñoz,** 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 **10.04.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 12 de abril de 2012.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Às agruras e aos tempos difíceis pois nos tornam mais fortes e melhores.

AGRADECIMENTOS

A Deus. Apesar de toda a pletora de informações e contextos vivenciados, meu espírito não consegue refutar a existência de Deus. Sou um homem que crê em Deus e que nele tudo confia. Deus, revelado nas escrituras sagradas, me induz a ser íntegro, humilde, compreensivo, altruísta e sensível para com o próximo.

A Uma das grandes incentivadoras e instrutoras para o que eu sou hoje: minha mãe. Com ela aprendi a ser humilde, trabalhador e obstinado. E essa tese, portanto, tem uma influência grande dela. Obrigado mãe!

Ao meu pai por ter me ensinado a ser uma pessoa responsável para com os deveres. Você é e sempre será o melhor pai do mundo!

A minha irmã por seu amor incondicional e por me dá força e palavras sábias sempre que preciso. Ela que me lê como nenhuma outra pessoa. Te amo!

A profa. Dra. Carla Romano, que me iniciou nesse mundo de pesquisa e que tanto me ensinou e incentivou. Da Iniciação cientifica até o mestrado. Boa parte do que sou hoje como profissional é graças a ti.

Ao prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda pela oportunidade única e por sempre acreditar na minha potencialidade e nas minhas capacidades. Uma pessoa muito sensível que se mostrou solícita e compreensiva todas as vezes em que eu estava desanimado ou com milhares de preocupações na cabeça. Sempre disposto a ouvir e a me dar conselhos. Obrigado!

A Martha Urán, uma colombiana com quem tive o privilégio de trabalhar, aprender e ainda se tornar amigo. Você é uma pessoa muito importante na minha vida. Todas as vezes em que precisei você sempre esteve lá. E em um dos momentos mais difíceis da minha vida foi você a responsável por inserir uma importante pessoa na minha caminhada. Eternamente grato!

A meu grande amigo, Tauá. Uma amizade linda. Chamamos um ao outro de alcunhas carinhosas, dizemos "eu te amo" e pode passar tempos e tempos sem se falar mas quando nos falamos é como se o tempo não tivesse passado. Uma amizade real. Sem cobranças. Um irmão. Mesmo a distância sempre me dando força quando parecia que a tinha perdido. Sempre com humor nos momentos mais críticos.

A minhas mães da terra da garoa: Dona Celina e Dona Nina. Vocês também fizeram parte dessa caminhada.

A disposição dos fatos no ano de 2016. Foi um ano crítico e que me levou a grandes mudanças internas, algumas delas muito importante para a minha vida profissional.

A Kau Mariko. Embora tenhamos seguido rumos distintos, durante três dos cinco anos de doutorado você foi meu porto seguro e me ensinou o que ser e o que não ser.

A Mariana Doprado. Uma argentina que veio fazer pós-doutorado no laboratório e com quem eu pude aprender mais o idioma dos nossos vizinhos e que também pude compartilhar milhares de momentos especiais. Você foi essencial nessa caminhada também com os seus diversos ensinamentos. Gracias a la vida por conocer-te!!!

A profa. Dra. Kelly Ishida, por proporcionar que eu tivesse perspectivas de me manter em São Paulo por mais um tempo. Obrigado pelas conversas e por me apresentar à CHEM4U.

A meus companheiros de trabalho do Laboratório e, posso dizer amigos para a vida: Glauce, Thor, Adriana Magalhães, Shirlei, Adriana Menezes, Fernanda, Oriana, Felipe, Renata, Luciana, Julian, Zita, Marcelo, Cleison, Leandro, Ana Camila, Ágata, Samuel, Camila, Viviani, Elúzia, Jane e Abigail. Todos vocês fizeram diferença na dinâmica de trabalho, ora ajudando nos experimentos e ora em momentos de descontração e relaxamento. Sentirei muitas saudades desse laboratório que só entra pessoas loucas e divertidas.

A diversos funcionários que foram essenciais para essa caminhada: Gisele (secretaria da Pós-Graduação), Naide e Isabel (secretarias do Departamento de Microbiologia), Mário (responsável pelo lixo hospitalar), Carlos e Marco (Biotério), dona Francisca (limpeza) e todos os guardas responsáveis pela portaria do ICB II (Anne, Sérgio, Celma, Eduardo, entre outros). Um agradecimento saudoso também as todos que faziam parte do SAT.

A todas as pessoas (professores, amigos e colegas) que direta ou indiretamente contribuíram para que o presente trabalho obtivesse êxito.

A Universidade de São Paulo pela oportunidade de estudar em uma das melhores universidades do mundo e por conceder uma excelente infraestrutura (circular, restaurante, complexo poliesportivo, bibliotecas, museus, entre outros).

Ao Instituto de Ciências Biomédicas por possibilitar o contato com os mais diversos pesquisadores nacionais e internacionais. Além disso, sou grato pela estrutura, pela informação e formação ministrada

AGRADECIMENTO À INSTITUIÇÃO DE FOMENTO

Agradeço imensamente a CAPES pela concessão da bolsa, modalidade cotas institucional, durante os 4 anos de doutorado. Sem esse aporte financeiro a presente tese não seria possível. Além disso, obrigado por possibilitar mais uma etapa da minha formação profissional. Espero retribuir da melhor forma possível com publicações e sendo um excelente profissional à serviço da sociedade brasileira e, quiçá, do mundo.

"A verdade é que não há nada de digno em ser superior a outra pessoa. A única nobreza genuína é ser superior a seu antigo eu."

Whitney M. Young Jr.

RESUMO

Dias LS. Envolvimento dos neutrófilos na modulação da resposta imune em camundongos BALB/c vacinados com o peptídeo P10 na paracoccidioidomicose experimental. [Tese (Doutorado em Microbiologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

A paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica e endêmica em diversos países da América Latina, principalmente no Brasil, Colômbia, Argentina e Venezuela, é um importante problema de saúde pública. Embora exista tratamento, o mesmo é prolongado e casos de recidiva são comuns. Nesse sentido, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, como as vacinas, são extremamente importante. Além disso, é imprescindível compreender a participação de diferentes populações células na resposta imune desencadeada pela vacina. Desse modo, o objetivo dessa tese foi avaliar a participação dos neutrófilos na resposta vacinal induzida pelo peptídeo P10 utilizando o modelo murino experimental na paracoccidioidomicose. Nossos resultados, *in vitro,* indicaram que a expressão de receptores como dectina-1, TLR-2 e TLR-4 em neutrófilos pode ser modulada sob efeito da vacina (peptídeo P10 associado ao lipídeo catiônico DODAB); *in vivo,* observamos que a vacina terapêutica reduziu a carga fúngica pulmonar em animais infectados por 15 ou 30 dias com redução de neutrófilos nos pulmões dos animais infectados por 15 dias. Estruturas sugestivas de NETs foram visualizadas nos pulmões dos animais com 15 dias de infecção. A administração passiva do anticorpo monoclonal Gr-1 (clone RB6/8C5), com especificidade contra Ly6C e Ly6G, levou a depleção dos neutrófilos. Vinte e quatro horas antes de cada imunização, a administração do anticorpo monoclonal Gr-1 indicou que neutrófilos são importantes no contexto da imunização, uma vez que a carga fúngica pulmonar não foi reduzida em comparação aos controles. Assim, concluímos que a vacina pode modular a infiltração dos neutrófilos no local da infecção, entretanto este fenômeno observado depende de variáveis entre elas, o momento que a infecção experimental é realizada.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis,* Neutrófilos, Vacina, Paracoccidioidomicose, P10.

ABSTRACT

Dias LS. Involvement of neutrophils in the modulation of the immune response in BALB/c mice vaccinated with the P10 peptide in experimental paracoccidioidomycosis. [thesis (Doctoral in Microbiology)]. - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

Paracoccidioidomycosis, a systemic mycosis and endemic in several Latin American countries, mainly in Brazil, Colombia, Argentina and Venezuela, is an important public health problem. Although there is treatment, it is prolonged and cases of relapse are common. In this sense, the development of new therapeutic approaches, such as vaccines, is extremely important. In addition, it is imperative to understand the participation of different cell populations in the immune response triggered by the vaccine. Thus, the aim of this thesis was to evaluate the participation of neutrophils in the vaccine response induced by the P10 peptide using the experimental murine model in paracoccidioidomycosis. Our results, *in vitro*, indicated that the expression of receptors such as dectin-1, TLR-2 and TLR-4 in neutrophils can be modulated under the effect of the vaccine (peptide P10 associated with the cationic lipid DODAB). *In vivo*, we observed that the therapeutic vaccine reduced lung fungal load in infected animals for 15 or 30 days with reduced neutrophils in the lungs of infected animals for 15 days. Structures suggestive of NETs were visualized in the lungs of animals with 15 days of infection. Passive administration of Gr-1 monoclonal antibody (clone RB6 / 8C5), with specificity against Ly6C and Ly6G, led to neutrophil depletion. Twenty-four hours before each immunization, administration of Gr-1 monoclonal antibody indicated that neutrophils are important in the immunization context, since lung fungal load was not reduced in comparison to controls. Thus, we conclude that the vaccine can modulate the infiltration of neutrophils at the site of infection, however this phenomenon observed depends on variables between them, the moment the experimental infection is performed.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, Neutrophils, Vaccine, Paracoccidioidomycosis, P10.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estratégia para análise de expressão indireta de TLR-2, TLR-4 e dectina-1 em neutrófilos murinos. 45

Figura 2 - Modelos experimentais 47

Figura 3 - Estratégia de análise para imunofenotipagem de neutrófilos no pulmão. 50

Figura 4 - Esquema do protocolo de depleção neutrofílica transitória.....52

Figura 5 - Estratégia de análise de linfoproliferação por citometria de fluxo. 54

Figura 6 - Envolvimento diferencial de TLR-2 e Dectina-1 na morte de *P. brasiliensis* por neutrófilos murinos. 55

Figura 7 - Distribuição de tamanho, potencial zeta (carga) e polidispersão (PI) do peptídeo P10 associado ou não com o lipídeo catiônico.....56

Figura 8 - Expressão de TLR-2 em neutrófilos de camundongos das linhagens BALB/c, C57Bl/6 e B10.A, estimulados com a vacina P10+DODAB.....57

Figura 9 - Expressão de TLR-4 em neutrófilos de camundongos das linhagens BALB/c, C57Bl/6 e B10.A, estimulados com a vacina P10+DODAB.....58

Figura 10 - Expressão de dectina-1 em neutrófilos de camundongos das linhagens BALB/c, C57Bl/6 e B10.A, estimulados com a vacina P10+DODAB.....59

Figura 11 - Fagocitose e morte de *P. brasiliensis* por neutrófilos estimulados com a vacina (P10+DODAB). 60

Figura 12 - Carga fúngica nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.....61

Figura 13 - Análise histológica nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.....62

Figura 14 - Análise de fibrose nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.....64

Figura 15 - Quantificação das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e IFN-γ nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.....65

Figura 16 - Quantificação de IL-1β, TNF-α, GM-CSF e MCP-1 nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.....66

Figura 17 - Quantificação das citocinas IL-17 e IL-23 nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica. 67

Figura 18 - Quantificação de leucotrieno B_4 nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica. 68

Figura 19 - Detecção de neutrófilos nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica....69

Figura 20 - Presença de NETs nos pulmões de camundongos infectados por 15 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica. 71

Figura 21 - Presença de NETs nos pulmões de camundongos infectados por 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica. 72

Figura 22 - Carga fúngica pulmonar em camundongos com depleção periférica de neutrófilos.....74

Figura 23 - Análise histológica dos pulmões de camundongos com depleção periférica de neutrófilos. 75

Figura 24 - Quantificação das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e IFN-γ nos pulmões de camundongos com depleção periférica de neutrófilos. 76

Figura 25 - Quantificação das citocinas IL-1β, TNF-α, MCP-1 e GM-CSF nos pulmões de camundongos com depleção periférica de neutrófilos. 77

Figura 26 - Quantificação das citocinas IL-17 e IL-23 nos pulmões de camundongos com depleção periférica de neutrófilos. 78

Figura 27 - Quantificação de leucotrieno B_4 nos pulmões de camundongos com depleção periférica de neutrófilos.....78

Figura 28 - Ensaio de linfoproliferação *ex vivo*. 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise hematológica de camundongos depletados com o anticorpo anti-Gr-1..... 72

Tabela 2 – Diferenças observadas no grupo tratado com a vacina comparada ao grupo controle infectado nos diferentes modelos *in vivo*..... 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	*Brain Heart Infusion* (infusão de cérebro e coração)
CD	*Cluster of Designation/Differentiation* (grupo de designação/diferenciação)
CFSE	*Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester* (Ester succinimidil de carboxifluoresceína)
cm	Centímetro
DMSO	Dimethyl sulfoxide (Dimetil sufóxido de sódio)
DODAB	*Dimethyldioctadecylammonium bromide* (Brometo de dioctadecildimetilamônio)
EDTA	*Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	*Enzimatic Linked ImmunoSorbent Assay* (ensaio imunoabsorvente ligado a enzima)
FACS	*Fluorescein Activated Cell Sorting* (Separação celular ativada por fluoresceína)
FITC	*Fluorescein Isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)
FMOs	*Fluorescence Minus-One* (fluorescência menos um)
GM-CSF	*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (Fator estimulado de colônia de granulócito e macrófago)
HTT	Hipersensibilidade do Tipo Tardia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IDD	Imunodifusão dupla
IFN	Interferon
IL	Interleucina

KDa	Kilodalton
Kg	Kilograma
LPS	Lipopolisacarídeo
LTB_4	Leucotrieno B_4
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
M	Molar
MACS	*Magnetic Activated Cell Sorting* (Separação celular ativada por magnetismo)
MCP	*Monocyte Chemoattractant Protein* (Proteína quimioatraente de monócito)
mg	Miligrama
MHC	*Major Histocompatibility Complex* (Complexo principal de histocompatibilidade
mM	Milimolar
NETs	*Neutrophils Extracelullar Traps*
NK	*Natural Killer*
NO	*Oxide nitric* (óxido nítrico)
Pb18	*Paracoccidioides brasiliensis* isolado 18
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	*Polymerarase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
PMA	Phorbol-12-miristato-13-acetato
RPM	Rotação Por Minuto
SFB	Soro Fetal Bovino

SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
TBS	*Tris Buffer Solution* (Solução tampão de Tris)
TGF	*Transforming Growth Factor* (Fator de transformação do crescimento
TLR	*Toll-Like Receptor* (Receptor do tipo Toll)
TMB	3,3′,5,5′-*Tetramethylbenzidine* (3,3′,5,5′- Tetrametilbenzidina)
TNF	*Tumoral Necrosis Factor* (Fator de necrose tumoral)
U	Unidades
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
2 OBJETIVOS 24
2.1 Objetivo geral 24
2.2 Objetivos específicos 24
3 REVISÃO DE LITERATURA 25
3.1 Aspectos gerais sobre a paracoccidioidomicose 25
3.2 Etiologia e filogenia 27
3.3 Aspectos ecológicos do fungo *Paracoccidioides* 28
3.4 Infecção e manifestações clínicas 29
3.5 Diagnóstico e tratamento 32
3.6 Neutrófilos e resposta imune 33
3.7 Peptídeo P10 como antígeno vacinal 36
4 MATERIAL E MÉTODOS 40
4.1 Participação de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 na morte intracelular ou extracelular de leveduras de *P. brasiliensis* por neutrófilos murinos 40
4.1.1 Animais 40
4.1.2 Purificação de neutrófilos murinos provenientes da medula óssea 40
4.1.3 Isolado e cultivo de P. brasiliensis 41
4.1.4 Ensaio de morte de P. brasiliensis por neutrófilos murinos 41
4.2 Efeito da vacina (P10+DODAB) na PCM experimental: expressão de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 em neutrófilos de camundongos C57Bl/6, BALB/c e B10.A 42
4.2.1 Animais 42
4.2.2 Lipídeo catiônico DODAB 42
4.2.3 Peptídeo P10 43
4.2.4 Determinação de diâmetro, distribuição de tamanho, potencial zeta e polidispersão da associação P10/DODAB 43
4.2.5 Condições in vitro 43
4.2.6 Expressão de TLR-2, TLR-4 e dectina-1 por Citometria de Fluxo 43
4.3 Fagocitose e morte de *P. brasiliensis* por neutrófilos murinos estimulados com o peptídeo P10+DODAB na PCM experimental. 45
4.3.1 Marcação de leveduras de P. brasiliensis com FITC 45
4.3.2 Ensaio de fagocitose por Citometria de Fluxo 46
4.4 Modelo experimental *in vivo* 46

4.4.1 Animais 46
4.4.2 Grupos amostrais 46
4.4.3 Infecção intratraqueal (i.t) 46
4.4.4 Vacina terapêutica 47
4.4.5 Determinação de carga fúngica pulmonar 48
4.4.6 Histologia 48
4.4.7 Quantificação das citocinas IL-10, IL-12, IL-4, TNF-α, IFN-γ, MCP-1, GM-CSF, IL-17, IL-23 e IL-1β 48
4.4.8 Quantificação de leucotrieno B_4 49
4.4.9 Determinação de neutrófilos nos pulmões por citometria de fluxo 49
4.4.10 Imunofluorescência para avaliação de NETs nos pulmões 50

4.5 Modelo *in vivo* com depleção neutrofílica transitória 51
4.5.1 Obtenção do anticorpo anti-Gr1 51
4.5.2 Determinação da dose de anticorpo anti-Gr1 51
4.5.3 Indução de depleção neutrofílica transitória 52

4.6 Linfoproliferação *ex vivo* 52

4.7 Análise estatística 54

5 RESULTADOS 55

5.1 Participação de TLR-2, TLR-4 e dectina-1 na atividade de morte de neutrófilos murinos contra *P. brasiliensis* 55

5.2 Avaliação de tamanho, potencial zeta e polidispersão da associação entre o peptídeo P10 e o lipídeo catiônico DODAB 55

5.3 Subpopulações de neutrófilos: expressão de receptores TLR-2, TLR-4 ou dectina-1 quando estimulados com a formulação vacinal P10 + DODAB 57

5.4 Efeito da vacina (P10+DODAB) na PCM experimental: atividade sobre a fagocitose e morte de *P. brasiliensis* por neutrófilos murinos. 59

5.5 Modelo terapêutico com 15 ou 30 dias de infecção: carga fúngica pulmonar 60

5.6 Modelo terapêutico com 15 ou 30 dias de infecção: Análise histológica 61

5.7 Modelo terapêutico com 15 ou 30 dias de infecção: Perfil de citocinas 65

5.8 Modelo terapêutico com 15 ou 30 dias de infecção: Quantificação de leucotrieno B_4 67

5.9 Modelo terapêutico com 15 ou 30 dias de infecção: Determinação de neutrófilos nos pulmões 68

5.10 Modelo terapêutico com 15 ou 30 dias de infecção: Presença de NETs no pulmão 69

5.11 Efetividade vacinal na ausência de neutrófilos 73

5.12 Linfoproliferação induzida por neutrófilos estimulados com a vacina 80

6 DISCUSSÃO 81
7 CONCLUSÃO 90
REFERÊNCIAS 92

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de caráter granulomatoso endêmica em diversos países da América Latina, sendo Brasil, Colômbia e Venezuela os países que registram a maior parte dos casos. Alguns casos de importação foram registrados na Europa, Ásia e Estados Unidos. No Brasil, o Estado de São Paulo é responsável pela maior parte dos casos. Além disso, Os Estados do Mato Grosso, Mato do Grosso do Sul, Rondonia e Paraná registram atualmente muitos novos casos de PCM (Martinez, 2015).

No que diz respeito a etiologia da doença, é causada pelo fungo *Paracoccidioides* spp., sendo reconhecidas duas espécies: *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. É um fungo termodimórfico que apresenta-se na forma de bolor à 25 °C e na forma de levedura quando a 37 °C (Bagagli *et al.,* 2008). Há um consenso entre os pesquisadores de que a forma de bolor é a forma infectante e a levedura a forma patogênica.

É descrito que apenas uma pequena parcela dos indivíduos que entraram em contato com o fungo desenvolverão a doença (Benard, 2008). Desses, a maior parte irá manifestar a forma crônica (adulta) da doença que é essencialmente de base pulmonar associada ou não com o comprometimento de regiões muco-cutâneas, e que acomete geralmente indivíduos do sexo masculino, entre 35 e 60 anos e com atividades ligadas ao solo (Shikanai-Yasuda *et al.,* 2006). A outra forma da doença é a aguda (juvenil), caracterizada por início rápido e pelo comprometimento do sistema retículo-endotelial tanto em homens quanto mulheres (Benard, 2008). Em relação a faixa etária acometida ou são indivíduos jovens ou idosos.

O tratamento da PCM pode ser feito com derivados azólicos ou a associação sulfametoxazol-trimetropim na maioria dos casos. Entretanto, alguns casos mais graves requerem a utilização de anfotericina B (Shikanai-Yasuda, 2015). Embora haja tratamento, o mesmo é longo (de 6 meses até 2 anos) e casos de recidivas são frequentes. Além disso, alguns pacientes desenvolvem sequelas que podem incapacitá-los para a execução de suas atividades (Shikanai-Yasuda *et al.,* 2006).

Os casos de recidiva e sequelas observados na PCM demonstram claramente a necessidade de uma terapia mais efetiva. Nesse sentido, as possibilidades são

inúmeras. Por um lado, há a formulações de novos antifúngicos ou a modificações daqueles já disponíveis de modo a melhorar a distribuição, a biodisponibilidade e reduzir o tempo de tratamento e os efeitos tóxicos. Em outro polo, há o desenvolvimento de vacinas ou imunomoduladores que visam melhorar a resposta imune do hospedeiro e levar a resolução da doença. Nesse último polo é interessante perceber o desenvolvimento das chamadas vacinas terapêuticas e a possibilidade de administrar as mesmas junto a um regime de antifúngico, podendo reduzir dose e tempo de tratamento.

No que se refere a vacina em PCM, o nosso grupo de pesquisa, coordenado pelo Dr. Carlos Pelleschi Taborda, tem contribuído de forma expressiva. Há pelo menos 10 anos são realizados diversos estudos envolvendo o peptídeo P10 como antígeno vacinal voltado para PCM. Esse peptídeo é derivado de uma glicoproteína de 43 kDa, uma importante proteína de *P. brasiliensis* envolvida em diversos processos.

Os dados obtidos com P10 ao longo do tempo demonstram claramente sua efetividade em diferentes abordagens. No entanto, para que os estudos possam avançar e chegar até a fase clínica, é necessário que haja uma melhor caracterização da resposta imune envolvida, sobretudo no que diz respeito a participação de alguns tipos celulares.

Nesse sentido, em um dos estudos realizados pelo nosso grupo foi observado um intenso infiltrado neutrofílico nos pulmões de camundongos infectados com *P. brasiliensis* e que foram tratados com a vacina de P10. Paralelamente, esses animais apresentaram menor carga fúngica, resposta imune do tipo Th1 e tecido pulmonar mais preservado, quando comparado com o grupo controle, somente infectado com as leveduras.

Diante dos dados expostos acima, fica evidenciado a necessidade de melhor entendimento sobre a participação dos neutrófilos na dinâmica vacinal. É necessário investigar a vacina e a modulação das diferentes populações celulares como os neutrófilos, sobretudo no que se refere a expressão de receptores de reconhecimento padrão (TLRs, Dectina-1, entre outros) e na habilidade de morte e de fagocitose. Por outro lado, é importante demarcar a atividade dos neutrófilos no processo de imunização e na resposta imune final desencadeada pela vacina. Deste

modo, todo o exposto se enquadra como justificativa para a execução do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o envolvimento dos neutrófilos na resposta imune de camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com vacina terapêutica constituída pelo peptídeo P10 e pelo lipídio catiônico DODAB.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a intensidade de migração de neutrófilos nos pulmões de animais infectados com leveduras de *P. brasiliensis* por 15 ou 30 dias e vacinados com P10;

Avaliar a carga fúngica, perfil de citocinas, inflamação e fibrose nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias e vacinados com P10;

Determinar a importância dos neutrófilos no processo de imunização/tratamento;

Determinar a atividade dos neutrófilos na resposta imune final desencadeada pela vacina;

Avaliar os efeitos da depleção de neutrófilos pela utilizando anticorpo monoclonal RB6-8C5, em camundongos infectados ou infectados e vacinados com P10;

Determinar a indução ou presença de NETs (**N**eutrophil **E**xtracelullar **T**raps) nos pulmões dos animais infectados e/ou submetidos ao processo vacinal com P10;

Avaliar a expressão de TLR-2, TLR-4 e dectina-1 em neutrófilos estimulados *in vitro* com a vacina e analisar o impacto sobre a habilidade dessas células em fagocitar e matar leveduras de *P. brasiliensis*;

Determinar a existência de interação entre neutrófilos estimulados com P10 e linfócitos de camundongos infectados e/ou vacinados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais sobre a paracoccidioidomicose

As micoses pulmonares constituem importante problema de saúde pública para a população em geral, em virtude do número crescente de indivíduos acometidos, principalmente pacientes com algum tipo de comprometimento imunológico (terapia imunossupressora pós-transplante, uso de corticóide, SIDA e tratamento oncológico). Estas micoses atingem percentual bastante elevado em indivíduos em idade produtiva, levando muitas vezes, a incapacitação, sequelas e ocasionalmente a óbito (Shikanai-Yasuda *et al.,* 2006).

Dentre essas micoses, a paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica mais prevalente na América Latina, com 80% dos casos sendo registrados no Brasil, seguido de Colômbia, Venezuela e Argentina (Brummer *et al.,* 1993; Martinez, 2015). No Brasil, a maior parte dos casos se concentram nas regiões sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo), centro-oeste (Mato Grosso do Sul e Goiás) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Entretanto, outras regiões tem casos registrados, destacando-se os Estados do Pará, Tocantins, Maranhão e mais recentemente o Estado de Rondônia (Martinez, 2015).

A paracoccidioidomicose também foi registrada na Europa, EUA, África e Ásia, mas todos os casos foram revisados e considerados de importação uma vez que os indivíduos acometidos relataram terem visitado ou trabalhado em áreas endêmicas na América Latina (Martinez, 2015).

O primeiro pesquisador a descrever a PCM foi Adolfo Lutz, em 1908, em um trabalho no qual analisou dois pacientes que apresentavam lesões na mucosa oral (Negroni, 1993). A micose primeiramente foi denominada como Doença de Lutz-Splendore-Almeida, Blastomicose brasileira e depois por blastomicose sul-americana. Em 1971, durante o encontro internacional sobre PCM em Medellín (Colômbia), o termo paracoccidioidomicose foi aceito e utilizado mundialmente desde então (Almeida *et al.,* 2003).

Coutinho *et al.* (2002) estudando 3.181 óbitos por paracoccidioidomicose no Brasil, a partir de séries temporais de 16 anos (1980-1995), revelaram que durante esse período a PCM mostrou grande magnitude, sendo considerada como oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva entre as infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. A taxa de mortalidade média anual foi de 1,45/milhão de habitantes, predominando em indivíduos do sexo masculino, com 84,75% dos óbitos. O grupo etário entre 30-59 anos foi o mais atingido, seguido dos indivíduos com 60 anos ou mais (Coutinho *et al.,* 2002).

Em estudo desenvolvido por Bittencourt *et al.* (2005), sobre a mortalidade por paracoccidioidomicose no Estado do Paraná, no período de 1980 a 1998, utilizando-se como fonte de dados os registros de óbitos do SIM e a população estimada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a taxa de mortalidade média anual foi de 3,48 por milhão de habitantes e destacou-se como a quinta causa de mortalidade entre as doenças infecciosas e parasitárias predominantemente crônicas, apresentando a mais alta taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas (Bittencourt *et al.,* 2005).

Posteriormente, Prado *et al.* (2009), analisando dados epidemiológicos de 1996 a 2006, mostrou que no território brasileiro os maiores índices de mortalidade dessa micose concentram-se na região Sudeste, destacando-se os Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, e na região Sul, nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul. A PCM foi a principal causa de morte entre as micoses sistêmicas (Prado *et al.,* 2009).

Os estudos de incidência mostram que áreas estabilizadas apresentam uma estimativa entre 1 a 4 casos/cem mil habitantes/ano. Entretanto, Estados como Rondônia atingem 9,4 casos/cem mil habitantes/ano e algumas cidades do Estado podem até ultrapassam esses índices (Vieira *et al.,* 2014).

Nessa dinâmica epidemiológica, alterações sócio-ambientais podem mudar a distribuição da doença no território brasileiro ou mesmo a incidência e prevalência. Nesse sentido, alterações climáticas provocadas pelo fenômeno *El niño* entre 1982 e 1983 foram associadas com casos de PCM aguda/subaguda ocorridos de 1 a 2 anos depois na região Sudeste (Barrozo *et al.,* 2010). O aumento de casos no Estado de Rondônia tem sido associado ao desmatamento e consequente implantação de áreas destinadas a agricultura ou a criação de gado (Vieira *et al.,* 2014). Em

contrapartida, tem sido observado uma redução no número de casos de PCM aguda no Estado do Mato Grosso do Sul, provavelmente resultante do combate ao trabalho infantil (Fabris *et al.,* 2014).

Não obstante, é relevante saber que a PCM é inserida como um grave problema de saúde pública uma vez que acomete principalmente homens na fase mais produtiva da vida, visto que 84,75% dos casos ocorrem entre 30 e 60 anos, e que resultam em sequelas secundárias à infecção podendo incapacitar o indivíduo para o trabalho (Brummer *et al.,* 1993; Martinez, 2015).

Entretanto, apesar de todo o contexto epidemiológico, o Ministério da saúde não incluiu a paracoccidioidomicose na lista de doenças de notificação compulsória, assim alguns autores não acreditam que os dados existentes reflitam a realidade da doença (Shikanai-Yasuda *et al.,* 2006).

3.2 Etiologia e filogenia

O principal agente etiológico da paracoccidioidomicose é o fungo termo-dimórfico do gênero *Paracoccidioides* spp. Inicialmente, Splendore, em 1912, designou o fungo como *Zymonema brasiliensis*, mas Floriano de Almeida, em 1930, comparando as diferenças acentuadas nas características morfológicas e biológicas do fungo da micose sul-americana e de *Coccidioides immitis* propôs o nome de *Paracoccidioides brasiliensis*, assim classificando o novo achado em um novo gênero e espécie. Recentemente foi descrito uma nova espécie, *P. lutzii*, responsável principalmente por casos da doença na região Centro-Oeste do território brasileiro (Teixeira *et al.,* 2009).

Alguns pesquisadores supõem que o fungo *Paracoccidioides* spp. ocorre como saprófito no solo, onde provavelmente está na forma de micélio. Sua transição morfológica é dependente de temperatura, apresentando forma miceliana entre 19 ^{o}C – 23 ^{o}C e forma de levedura entre 36 ^{o}C – 37 ^{o}C (San-Blas *et al.,* 2002).

Recentemente foi descrito o que parece ser um novo isolado não cultivável de *P. brasiliensis* que está envolvido em lesões cutâneas em golfinhos (Vilela *et al.,* 2016). Essa conclusão foi obtida a partir de análises genéticas de DNA extraído de granulomas cutâneos em golfinhos da espécie *Tursiops truncatus.* Essa análise

revelou 100% de homologia com *P. brasiliensis* e 93% com *P. lutzii* (Vilela *et al.,* 2016).

Inicialmente *Paracoccidioides* spp. era considerado como fungo imperfeito, em virtude da sua fase sexual não ter sido caracterizada, mas com o refinamento das técnicas moleculares este fungo passou a ser classificado como pertencente à família Onygenaceae *sensu latu* (ordem Onygenales, filo Ascomycota) {Formatting Citation}. Posteriormente, foi proposto um clado monofilético distinto de Onygenaceae *lato sensu*, sendo denominada família Ajellomycetaceae que incluem os gêneros *Blastomyces, Emmonsia, Histoplasma* e *Paracoccidioides* (Untereiner *et al.*, 2004). Um importante traço compartilhado por todos os membros dessa família é a sua adaptação aos vertebrados.

Os estudos filogenéticos tem classificado *P. brasiliensis* em quatro espécies crípticas (S1, PS2, PS3 e PS4) com diferentes características evolutivas e distribuição geográfica. S1 é considerado um grupo monofilético recombinante e com ampla distribuição da América do Sul, sendo responsável pela maior parte dos casos de PCM. PS2 também é recombinante só que parafilético, e é encontrado no Brasil e na Venezuela. Já PS3 é uma população clonal e monofilética, sendo registrada só na Colômbia. Por sua vez, o grupo PS4 foi recentemente introduzido e é classificado como um grupo monofilético de isolados clínicos da Venezuela (Matute, 2005; Theodoro *et al.,* 2012).

Em relação a *P. lutzii*, estima-se que o seu grupo monofilético foi separado dos grupos S1, PS2 e PS3 a aproximadamente 30 milhões de anos atrás. Esta espécie é endêmica nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil (Estados de Rondônia, Mato Grosso e Goiás) e compartilha algumas áreas geográficas com o grupo S1 (Teixeira *et al.,* 2013).

3.3 Aspectos ecológicos do fungo *Paracoccidioides*

O fungo *Paracoccidioides* spp. é predominantemente encontrado em regiões de clima úmido, com temperaturas médias de 17 a 24 °C, alto índice pluviométrico, solo ácido e vegetação densa, como florestas tropicais e subtropicais (Restrepo, 1985; Brummer *et al.,* 1993). Em um elegante trabalho foi observado que *Paracoccidioides* spp. cresce bem em solos arenosos e argilosos quando a umidade

é alta, enquanto que na condição de baixa umidade não há crescimento (Terçarioli *et al.,* 2007). Também foi observado que o fungo é incapaz de crescer em alguns solos contendo altas quantidades de alumínio trocável e baixa saturação de bases (Terçarioli *et al.,* 2007).

Além destes fatores, os hospedeiros de *Paracoccidioides* spp. têm grande relevância na compreensão de sua ecologia. Excetuando o homem, o hospedeiro mais comum é o tatu-de-nove-faixas (*Dasypus novemcintus*), sendo o fungo isolado desses animais por grupos de pesquisa do Brasil e da Colômbia (Corredor *et al.,* 1999; Restrepo *et al.,* 2001; Bagagli *et al.,* 2003). Nesta espécie de tatu o fungo tem sido isolado em 75-100% dos animais capturados em áreas hiperendêmicas de PCM, mostrando uma alta frequência de infecção (Restrepo *et al.,* 2001; Bagagli *et al.,* 2003). Estes isolados são indistinguíveis dos isolados clínicos em termos de antígeno, virulência e perfil molecular, confirmando que o mesmo genótipo infecta animais e humanos (Hebeler-Barbosa *et al.,* 2003). Corredor *et al.* (2005) isolaram *Paracoccidioides* de outra espécie desse mamifero: tatu de cauda nua (*Cabassous centralis*).

Os tatus apresentam algumas características que parecem favorecer a infecção por leveduras de *Paracoccidioides* spp., como ótima temperatura corporal (entre 32,7 e 35 °C), baixa imunidade celular e constante contato com o solo (Eduardo Bagagli et al., 2008). É hipotetizado que o parasitismo nesses animais possibilitaria a preservação da forma saprófita e contribuiria para a reprodução sexual, por promover a proximidade de tipos de acasalamentos em um ambiente protegido, como o tecido ou órgãos do tatu (Bagagli *et al.,* 2006). Além disso, os tatus parecem ter um importante envolvimento na evolução de *Paracoccidioides* spp. para a condição zoofílica (Bagagli *et al.,* 2006). O fungo também já foi isolado de cães, pinguins, bicho-preguiça e fezes de morcego (Grose,Tamsitt, 1965; de Farias *et al.,* 2011; Trejo-Chávez *et al.,* 2011).

3.4 Infecção e manifestações clínicas

A aquisição do fungo pelo hospedeiro humano ocorre através da inalação de conídios produzidos na sua fase miceliana. O tamanho reduzido destes (menores que 5 µm) permite ao fungo atingir os alvéolos pulmonares, local de início da

infecção e onde ocorre a transição para a sua fase leveduriforme (Restrepo *et al.,* 2001). A levedura apresenta parede celular espessa e birrefringente, como diâmetro variando de 5 a 30 µm e podendo apresentar brotamentos únicos ou múltiplos, sendo este último aspecto chamado de “roda de leme” (De Oliveira *et al.,* 2015).

Alguns fatores que influenciam a dinâmica da infecção humana por *Paracoccidioides* incluem o desmatamento acelerado e o revolvimento do solo para o plantio (Barrozo *et al.,* 2009). É especulado que tais atividades trazem o fungo, que inicialmente encontrava-se entre 2 a 20 cm abaixo da terra, para a superfície onde poderá ser inalado pelo trabalhador (Bagagli *et al.,* 2008). Outro fator relevante para infecção do indivíduo trata-se da interação entre temperatura, umidade relativa do ar e chuva, que podem favorecer a formação de aerossóis contendo os esporos do fungo (Barrozo *et al.,* 2009).

Após inalação dos conídios ou fragmentos de micélio pelo hospedeiro, o patógeno é convertido para a forma de levedura, estabelecendo a infecção. O fungo pode permanecer confinado aos pulmões ou se disseminar largamente a órgãos e tecidos, dando origem a diferentes manifestações clínicas da doença. A classificação clínica da PCM compreende a PCM-infecção e a PCM-doença. Em pacientes com PCM-infecção, a resposta imunológica apresenta-se satisfatória e o desenvolvimento do foco infeccioso é contido, embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica, evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina (Benard *et al.,* 1996) .

A maioria dos indivíduos que entram em contato com o fungo consegue conter a infecção e não desenvolver a doença, este dado pode ser comprovado quando se analisa a alta taxa de moradores de áreas endêmicas que apresentam positividade no teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardia (HTT) para antígenos do fungo, mas não apresentam sintomas da doença (Bethlem *et al.,* 1999). Nestas situações, há formação de lesões fibróticas no pulmão (complexo primário pulmonar) e o foco infeccioso desaparece. O fungo permanece em latência, mas continua viável e, caso haja um desequilíbrio na relação parasita-hospedeiro, a infecção pode progredir para PCM-doença (Franco *et al.,* 1987).

A PCM-doença pode ser dividida em duas formas clínicas principais: aguda ou subaguda e crônica. A razão dessa distinção clínica não está clara e presume-se

que características específicas da relação parasita-hospedeiro contribuam para isso (Benard, 2008). A forma aguda é mais severa e pode levar semanas ou meses para manifestar-se, sendo responsável pelas altas taxas de mortalidade provocadas pela doença. Pode afetar ambos os sexos e atinge o sistema reticuloendotelial, com hipertrofia dos linfonodos, hepatomegalia e/ou esplenomegalia (Singer-Vermes *et al.,* 1995; Fabris *et al.,* 2014) . Exames histológicos do pulmão demonstram processos granulomatosos frouxos, pouco organizados, contendo numerosos fungos viáveis (Queiroz-Telles, Escuissato, 2011).

Os pacientes com a forma aguda/subaguda da doença apresentam respostas imunes mediadas por células altamente deprimidas, permitindo o desenvolvimento de uma resposta imune humoral com presença de altos títulos de anticorpos, tanto específicos, quanto inespecíficos, pois há uma ativação policlonal de células B. Há, neste caso, o predomínio de um padrão Th2 e eosinofilia (Benard *et al.,* 1997).

A forma crônica da PCM corresponde a mais de 90% dos casos, atingindo trabalhadores rurais do sexo masculino com idade entre 30 e 50 anos (Verli *et al.,* 2005). O fungo pode ficar latente durante meses ou anos e quando manifestado, afeta mucosa e pulmões, podendo levar à morte devido ao comprometimento das funções pulmonares (Singer-Vermes *et al.,* 1995; Queiroz-Telles, Escuissato, 2011).

Na fase assintomática, a PCM caracteriza-se pela presença de granulomas nos pulmões ou linfonodos que, dependendo do sistema imune do hospedeiro, são reativados, ocorrendo progressão da doença e disseminação do fungo para outros órgãos (Souza *et al.,* 1998; Cavassani *et al.,* 2006). Dependendo do caso, a PCM pode deixar sequelas graves no paciente, pois provoca fibrose nos órgãos atingidos (Benard, 2008). Cerca de 25% dos doentes apresentam lesões restritas aos pulmões (forma unifocal), os demais podem apresentar a forma multifocal da doença que compromete principalmente as mucosas, pele e linfonodos (Brummer *et al.,* 1993).

Os pacientes com a forma crônica da PCM apresentam níveis elevados de IL-12 e IFN-γ*,* citocinas relacionadas a desenvolvimento da resposta imune celular, sugerindo controle da infecção ou uma manifestação menos grave da doença (Baida *et al.,* 1999). O hospedeiro apresenta a resposta imune celular parcialmente preservada, com baixos títulos de anticorpos e granulomas epitelióides melhor

organizados contendo poucos fungos, contrário ao que acontece na forma aguda (Franco *et al.,* 1987; Brummer *et al.,* 1993).

A aparente resistência das mulheres à doença ocorre devido à presença de níveis altos do hormônio estradiol, que inibe a transformação de micélio para a forma infectante da levedura. É proposto que o 17-β estradiol bloqueia a síntese de proteínas das leveduras de *Paracoccidioides* que se expressam durante a transformação da fase de micélio para levedura (Loose *et al.,* 1983; Salazar *et al.,* 1988).

Posteriormente à resolução da doença, alguns pacientes podem apresentar algumas sequelas graves ou moderadas, algumas das quais podem ser incapacitantes. As principais sequelas envolvem o pulmão, onde pode ser observada intensa fibrose pulmonar (Shikanai-Yasuda *et al.,* 2006). Esta alteração é provocada principalmente pelo acúmulo de colágeno no tecido que foi induzido pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e pelo fator de crescimento transformante beta (TGF-β), presentes a níveis maiores no estágio avançado da resposta inflamatória (Shikanai-Yasuda *et al.,* 2006).

Além do pulmão, outras partes do corpo também podem apresentar sequelas: glândula adrenal, sistema nervoso central, mucosas e pele. E, nestes casos as sequelas são as mais diversas. Os pacientes podem desenvolver doença de Addison, déficit motor, epilepsia, hidrocefalia, disfonia por lesão de corda vocal, obstrução laríngea com necessidade de traqueostomia, redução da rima bucal e microstomia peri-oral (Shikanai-Yasuda *et al.,* 2006).

3.5 Diagnóstico e tratamento

Em relação ao diagnóstico para PCM, existem diversas metodologias utilizadas, mas o método considerado padrão ouro é a identificação de elementos fúngicos das leveduras de *Paracoccidioides,* em exame a fresco de espécimes clínicos (escarro, lavado brônquico ou broncoalveolar, secreções, raspados de lesões e biópsia mucocutâneas) ou o isolamento do fungo em meio de cultura (Moreto *et al.,* 2011). Contudo, em algumas situações, dependendo do estado físico

ou clínico dos pacientes, torna-se impossível o acesso ao local de lesão e a coleta do material biológico (Marques-Da-Silva *et al.,* 2006).

Nestes casos, a pesquisa de antígenos e anticorpos circulantes específicos no soro de pacientes assume grande importância no diagnóstico indireto e comprobatório da infecção (Elias Costa *et al.,* 2000; Do Valle *et al.,* 2001). Assim, os ensaios sorológicos têm sido uma das principais ferramentas para o diagnóstico confirmatório e monitoramento das respostas dos pacientes ao tratamento, permitindo a obtenção de resultados mais rápidos, quando comparados aos exames de cultura e histológico (Del Negro *et al.,* 2000; Marques-Da-Silva *et al.,* 2006). De fato, em alguns casos o resultado sorológico se traduz na primeira indicação da doença, principalmente naqueles indivíduos que ainda não apresentam sinais clínicos aparentes (Zoilo Pires De Camargo, 2008).

Os testes diagnósticos sorológicos comumente empregados na confirmação da PCM são a imunodifusão dupla em gel de agarose (IDD) (Del Negro *et al.,* 2000; Camargo *et al.,* 2003), imunofluorescência indireta (Mistreta *et al.,* 1985; Del Negro *et al.,* 2000), ensaios imunoenzimáticos como o ELISA (de Almeida *et al.,* 2002) e *immunoblotting* (Do Valle *et al.,* 2001; Silva *et al.,* 2008). Além disso, algumas técnicas moleculares têm sido empregadas com a mesma finalidade, como a técnica da PCR, do *nested* PCR e do PCR em tempo real (Bialek *et al.,* 2000; Gomes *et al.,* 2000; Buitrago *et al.,* 2009).

O tratamento dos casos de PCM é feito com antifúngicos da classe dos sulfanilamídicos (sulfametoxazol/trimetoprim), anfotericina B e os derivados azólicos (cetaconazol e itraconazol). Na maioria dos casos a terapia antifúngica empregada é satisfatória, levando à cura do paciente. Entretanto, o tratamento é longo, podendo durar de 2 a 6 meses e em alguns casos, perdurar por 2 ou mais anos, sendo comum a interrupção do tratamento (Marques *et al.,* 2006; Shikanai-Yasuda *et al.,* 2006). Além disso, casos de resistência aos derivados azólicos e a sulfametoxazol/trimetoprim têm sido registrados (Hahn *et al.,* 2003).

3.6 Neutrófilos e resposta imune

As diferentes manifestações da PCM correlacionam-se com fatores diversos, tais como virulência e patogenicidade do agente infeccioso e suscetibilidade do sistema imunológico do hospedeiro (Shikanai-Yasuda *et al.,* 2006). A resposta imune

celular mediada é a principal forma de defesa do organismo contra a PCM (Gil Benard, 2008). Indivíduos assintomáticos, considerados resistentes à doença, ou com formas menos severas de PCM, em geral, apresentam resposta positiva em testes de hipersensibilidade tardia (HTT) para antígenos específicos de *Paracoccidioides* spp.(Mota *et al.,* 1985). Esse padrão de resposta é esperado, uma vez que as reações de HTT são mediadas por células T $CD4^+$ do tipo Th1, responsáveis pela produção de interferon gama (IFN-γ) e de interleucina 2 (IL-2) e diversos autores têm demonstrado que respostas do tipo celular (Th1) predominam na resistência à PCM severa (Benard *et al.,* 1996; de Oliveira *et al.,* 2008).

Por outro lado, indivíduos com PCM disseminada apresentam predomínio de resposta do tipo Th2, com aumento da expressão de IL-4, IL-5 e IL-10, diminuição dos níveis de IFN-γ (Peraçoli *et al.,* 2003) e presença de elevados títulos de anticorpos específicos (Benard *et al.,* 1997; Chiarella *et al.,* 2007).

Não obstante, a resposta inata constitui a primeira linha de defesa do organismo, controlando o crescimento inicial dos patógenos e influenciando na resposta adaptativa. Essa reposta atua diretamente através da destruição do patógeno por meio da fagocitose e/ou pela secreção de compostos microbicidas. Além disso, pode estimular a resposta adaptativa através da produção de mediadores pró-inflamatórios, na indução de moléculas co-estimulatórias, e na captura e apresentação de antígenos (Calich *et al.,* 2008).

Como a PCM não é diagnosticada logo após a infecção inicial, os estudos se concentram em respostas tardias, como a resposta adaptativa humoral e a celular (Calich *et al.,* 2008). Nos pulmões, macrófagos alveolares, células dendríticas, neutrófilos e células NK são as principais células responsáveis em organizar e atuar na resposta inata. Na presença de IFN-γ, os macrófagos fagocitam o fungo, impedem a sua replicação intracelular *in vitro* e inibem o dimorfismo por ação do óxido nítrico (Gonzalez *et al.,* 2000).

Os neutrófilos, por sua vez, parecem ser a primeira barreira contra *Paracoccidioides* spp. e a produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio são essenciais nesse processo (Reeves *et al.,* 2003). Na estrutura do granuloma há população aumentada de neutrófilos que além de eliminar o fungo por

fagocitose, podem desenvolver vacúolos extracelulares para quando o tamanho de fungo é muito grande (Dias *et al.,* 2004).

De acordo com alguns autores, existe a habilidade única e intrínseca dos neutrófilos de alguns indivíduos em processar células de *Paracoccidioides brasiliensis,* o que os tornaria mais resistentes à paracoccidioidomicose (Goihman-Yahr *et al.,* 1980). Estudo usando camundongos BALB/c atímicos, revelou que a suscetibilidade à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* é exacerbada nesses animais, demonstrando a importância dos linfócitos T e de outras substâncias secretadas/produzidas pelo timo que agem na imunidade do hospedeiro. Além disso, esses camundongos foram capazes de controlar a infecção nos estágios iniciais, sugerindo que mecanismos da imunidade inata têm importante envolvimento na resistência a PCM e que, provavelmente, os neutrófilos estão envolvidos (Burger *et al.,* 1996).

Recentemente, foi demonstrado que neutrófilos parecem ser importante na fase aguda (24 a 96 horas) da infecção, umas vez que a depleção destas células, 24 horas antes da infecção, resultou em maior carga fúngica pulmonar (Pino-Tamayo *et al.,* 2016). Em contrapartida, a depleção dos neutrófilos na fase crônica da doença tem efeito inverso. Isto é, há resolução da doença, sugerindo assim que os neutrófilos nesse contexto são prejudiciais (Puerta-Arias *et al.,* 2016). Deste modo, fica claro o envolvimento dual dos neutrófilos na PCM.

Não obstante, é importante perceber que a importância dos neutrófilos parece estar diretamente relacionada a constituição genética do hospedeiro. Assim, em camundongos da linhagem B10.A, suscetíveis à infecção por leveduras do gênero *Paracoccidioides*, os neutrófilos são de extremo valor na resposta imune. Já em camundongos da linhagem A/J, resistentes à doença, os neutrófilos parecem não ser importantes (Pina *et al.,* 2006).

É relevante entender que os neutrófilos, nos últimos 20 anos, têm adquirido cada vez mais o interesse da comunidade científica. Muito contrário ao que se pensava antigamente, os neutrófilos são vistos hoje como células que podem modular a resposta imune adaptativa (Mócsai, 2013). Nesse sentido, já tem sido demonstrado que os neutrófilos podem realizar apresentação antigênica, recrutamento de células para o local da infecção e modulação de resposta Th1 e

Th17 (Abi Abdallah *et al.,* 2011; Trentini *et al.,* 2016). Há diversos estudos demonstrando a importância dessas células no contexto de vacinas (Calabro *et al.,* 2011; Jee *et al.,* 2015).

Dentro da resposta imune inata, os chamados receptores de reconhecimento padrão assumem um papel chave na modulação da resposta. Estes receptores reconhecem padrões moleculares associados a patógenos e que são, na maior parte das vezes, invariáveis (Thomas, Schroder, 2013). Receptores similares a Toll (Toll-like receptor – TLR) tem sido as estruturas mais bem estudadas na resposta inata a diferentes organismos (Gonzalez, 2013).

O envolvimento de TLR-2 e TLR-4 nos neutrófilos durante a infecção por PCM foi investigado Acorci-Valério *et al.* (2010), que observaram que o isolado Pb18 utiliza o receptor TLR-4 para entrar nos neutrófilos. Contudo, essa interação não induz nos neutrófilos o aumento de mecanismos microbicidas, o que parece sugerir que o fungo utilize TLR-4 para infectar células fagocíticas, multiplicar-se e escapar de outras ações da imunidade inata (Acorci-Valério *et al.,* 2010).

Além da explosão respiratória e a liberação de grânulos bioativos, ocorre a liberação de redes extracelulares (neutrophil extracellular traps –NET) formada por fibras que contém majoritariamente cromatina e proteínas granulares e, que são ativadas por IL-8, GM-CSF, LPS, PMA e IFN-γ (Thomas, Schroder, 2013). Esta rede tem capacidade de ligar-se a fungos e resultam na ativação da NADP oxidase e na formação de espécies reativas do oxigênio requeridas para induzir morte celular (Urban *et al.,* 2006).

Em humanos, a formação de NETs foi observada em lesões tegumentares de pacientes com PCM (Della Coletta *et al.,* 2015). Além disso, foi demonstrado *in vitro* que neutrófilos humanos podem induzir um padrão diferente de NETs dependendo da virulência do isolado de *P. brasiliensis* (Della Coletta *et al.,* 2015). Nesse sentido, as NETs induzida por *P. brasiliensis* parece envolver a participação de dectina-1 (Bachiega *et al.,* 2015). Entretanto, outro estudo *in vitro* concluiu que a formação de NETs não leva a morte de *P. brasiliensis* (Mejía *et al.,* 2015).

3.7 Peptídeo P10 como antígeno vacinal

O longo tratamento antifúngico da PCM associado aos casos de recidiva, bem como o desenvolvimento de sequelas que incapacitam os indivíduos para a realização de suas atividades profissionais, torna-se urgente a necessidade de novas abordagens de terapia. Por um lado, isso pode ocorrer por vias clássicas como desenvolvimento de novos fármacos ou o melhoramento dos já existentes. Por outro lado, abordagens imunoterapêuticas parecem ser uma excelente saída.

Nesse sentido, o uso de vacinas profiláticas ou terapêuticas seriam uma opção para a proteção do hospedeiro ou para a redução do tempo de tratamento. Um dos estudos mais promissores em vacina diz respeito ao peptídeo P10, derivado da glicoproteína de 43 kDa (gp43) de *P. brasiliensis*. Esse peptídeo, constituído por 15 aminoácidos (QTLIAIHTLAIRYAN), foi o único peptídeo capaz de induzir proliferação de linfócitos T. Além disso, a imunização de camundongos com o peptídeo levou a uma proteção vigorosa contra o isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18), sendo este efeito atribuído a forte resposta imune celular mediada pela secreção de IFN-γ e IL-2 por linfócitos T (Taborda *et al.,* 1998).

Um fator importante na utilização de peptídeos sintéticos, como vacinas em diferentes populações, é o reconhecimento dos epitopos por células T de indivíduos que apresentam moléculas distintas de MHC. Em camundongos, o peptídeo P10 é apresentado pelas moléculas do MHC de classe II de três haplótipos diferentes de camundongos (BALB/c: H-2^d; A/Sn: H-2^a; C57Bl/6: H-2^b) (Taborda *et al.,* 1998). Através do programa TEPITOPE, utilizado para seleção de sequências peptídicas com maior probabilidade de ligação a múltiplas moléculas de HLA-DR em caucasianos, foi demonstrado que o peptídeo P10 é promíscuo, sendo importante candidato vacinal para ser utilizado em humanos (Iwai *et al.,* 2003).

Uma interessante abordagem foi realizada com o objetivo de associar o peptídeo P10 com o tratamento antifúngico. Nesse estudo, o tratamento conjunto com drogas como: itraconazol e sulfametoxazol/trimetropim mais o P10 mostrou efeito protetor, quando administrado às 48 horas ou 30 dias após a infecção com *P. brasiliensis*, reduzindo a carga fúngica nos pulmões, preservando a estrutura alveolar e prevenindo a disseminação do fungo para baço e fígado (Marques *et al.,* 2006).

Esses resultados foram também observados em camundongos anérgicos submetidos à quimioterapia e imunizados com o peptídeo, apresentando resposta Th1 protetora com incremento significativo nos níveis de IFN-γ e IL-12 (Marques *et al.,* 2008). Isto sugere que a vacinação com P10 pode ser utilizada para melhorar a quimioterapia convencional e reduzir o tempo de tratamento, inclusive nos casos de pacientes anérgicos (Marques *et al.,* 2008).

Outra abordagem promissora foi a vacina específica de DNA, baseada em plasmídeos contendo o inserto do gene de P10 e da interleucina 12 (IL-12), para imunização profilática e terapêutica de camundongos BALB/c e B10.A infectados com o isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18) (Rittner *et al.,* 2012). Essa formulação vacinal foi efetiva na eliminação do fungo, com recuperação das estruturas pulmonares e produção significativa dos níveis de IL-12 e IFN-γ (Rittner *et al.,* 2012). Adicionalmente, a imunização com o plasmídeo que codifica o P10 induz a proliferação de células de memória assim como células T reguladoras, ajudando na redução do dano tecidual decorrente da resposta imune protetora (de Amorim *et al.,* 2013). Dessa forma, os plasmídeos são importantes alternativas para a prevenção e o tratamento da PCM experimental.

Outra possibilidade vacinal, igualmente moderna, foi testada com excelentes resultados. A isso se refere a utilização de células dendríticas. Tendo isso em consideração, camundongos que receberam células dendríticas pulsadas com o peptídeo antes (via subcutânea) e depois (via subcutânea e intravenosa) da infecção intratraqueal com *P. brasiliensis*, levou à redução da carga fúngica nos pulmões. Os níveis de IFN-γ e IL-12 foram aumentados ao tempo que houve uma redução na produção de IL-10 e IL-4, em comparação com os grupos de animais não imunizados e àqueles que não foram tratados com as células pulsadas (Magalhães *et al.,* 2012).

A utilização terapêutica de células dendríticas pulsadas com o P10 também mostrou-se efetiva em reduzir a carga fúngica pulmonar em camundongos da linhagem BALB/c e B10.A imunossuprimidos com dexametasona e infectados com *P. brasiliensis* (Silva, 2014). Além disso, os animais assim tratados mostraram um parênquima pulmonar mais preservado e um padrão de resposta imune misto Th1/Th2.

A administração convencional de vacina por via subcutânea também é efetiva e mostra que o peptídeo P10 associado ao lipídio catiônico DODAB é uma excelente combinação vacinal contra PCM (Mayorga *et al.,* 2012). Além disso, a administração da vacina por via nasal também pode ser realizada, e a combinação do P10 mais flagelina, potente ativador de TLR-5, mostrou resultados contundentes (Braga *et al.,* 2009).

A atividade imuno-ativadora do peptídeo P10 associado a flagelina foi foi capaz de reduzir o crescimento metastático de um tipo de melanoma em camundongos (de Melo *et al.,* 2015). Assim, sugere-se que o peptideo P10 como um importante imunomodulador, abrindo maiores perspectivas de sua utilização em outras doenças.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Participação de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 na morte intracelular ou extracelular de leveduras de *P. brasiliensis* por neutrófilos murinos

4.1.1 Animais

Camundongos machos da linhagem C57Bl/6 selvagens ou nocautes para TLR-2, TLR-4 ou Dectina-1, com idade entre 6 e 8 semanas, foram obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais foram mantidos em gaiolas isoladoras com água e ração *ad libtum* no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Microbiologia (ICB/USP) até o momento da realização dos experimentos. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais de ética em experimentação animal (número do protocolo 044/2012).

4.1.2 Purificação de neutrófilos murinos provenientes da medula óssea

Os camundongos foram eutanaziados em câmara de CO_2 e a medula óssea da tíbia e do fêmur (2 pares/animal) foram retirados. Inicialmente, a pele que recobre os membros posteriores dos camundongos foi removida com auxílio de pinça e tesoura, e então foi realizado o deslocamento cuidadoso da articulação coxofemoral. O tecido muscular que reveste tíbia e fêmur foram removidos com auxílio de tesoura e o fêmur foi separado da tíbia.

Os ossos passaram por uma desinfecção externa por imersão em etanol 70% por 5 minutos, seguido por três lavagens (1 minuto cada) em solução tampão fosfato (PBS, pH 7,2) estéril e gelado. As extremidades dos ossos foram cortadas com tesoura estéril e a medula óssea foi obtida por lavagem do interior dos ossos com RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2 mM de EDTA (Sigma-Aldrich, Alemanha). O volume obtido foi centrifugado a 300 xg por 7 minutos à 4 °C. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi submetido à lise das hemácias, através da suspensão em NaCl a 0,2% por exatos 20 segundos, seguido da adição de igual volume de NaCl a 1,6%.

A suspensão obtida foi centrifugada e o *pellet* celular foi ressuspendido em PBS (pH 7,2) com 0,5% de albumina sérica bovina e 2 mM de EDTA (Tampão MACS, pH 7,2) contendo anticorpo biotinilado anti-Ly-6G (Miltenyi Biotec, Alemanha), seguida de incubação à 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado mais tampão MACS e micro-esferas anti-biotina (Miltenyi Biotec, Alemanha) e incubação à 4 °C por 15 minutos. As células foram então lavadas com tampão MACS e purificadas em colunas magnéticas LS (Miltenyi Biotec, Alemanha). As células purificadas foram submetidas à coloração panótica com Panótico Rápido LB (LaborClin, Brasil) e à citometria de fluxo para constatação de pureza.

4.1.3 Isolado e cultivo de P. brasiliensis

As amostras de *P. brasiliensis*, isolado Pb 18, foram mantidas sob a forma de levedura em ágar Fava-Netto e incubadas à 37 ºC, sendo repicadas a cada 15 dias. A massa fúngica de um tubo bem crescido foi transferida para erlenmeyer contendo 100 mL de meio BHI líquido (BD, EUA) e mantida à 37 °C sob agitação constante a 150 rpm por 7 dias. Posteriormente, a massa fúngica foi coletada e lavada 3 vezes com PBS (pH 7,2). A massa celular obtida foi ressuspendida em 30 mL de PBS (pH 7,2) e mantida em repouso por 20 minutos para que ocorresse a sedimentação dos grumos celulares. A porção superior contendo células individuais ou com poucos brotamentos foi coletada e a contagem realizada em câmara de Neubauer. A viabilidade das leveduras foi analisada através do corante vital azul de Trypan. Suspensão de leveduras com viabilidade celular igual ou superior a 90% foram usadas em todos os experimentos.

4.1.4 Ensaio de morte de P. brasiliensis por neutrófilos murinos

Os neutrófilos murinos purificados foram distribuídos em placas de cultura de 24 poços (5 x 10^5 células/ poço), contendo DMEM (Vitrocell, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Vitrocell, Brasil), 50 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Alemanha), 10 mM de HEPES (Sigma-Aldrich, Alemanha), 1 mM de piruvato de sódio (VETEC, Brasil), 0,1 mM de aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 100 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, Alemanha). As células foram estimuladas

ou não com 150 U/mL de interferon-γ recombinante de camundongo (rIFN-γ; eBioscience, EUA), por 12 horas em estufa umidificada à 37 °C com 5% de CO_2.

Posteriormente, foram adicionados sobre as células, as leveduras de *P. brasiliensis* (2,5 x 10^4 leveduras/poço) seguida de incubação por mais 24 horas. Após esse período, a placa foi centrifugada (400 xg por 10 minutos), o sobrenadante retirado e a cada poço foi adicionado 1 mL de água destilada estéril. Este último procedimento permite a ruptura dos neutrófilos e liberação das leveduras contidas em seu interior para que se tenha a estimativa precisa da morte das leveduras que foram fagocitadas pelos neutrófilos. Após 5 minutos da adição de água destilada nos poços, 100 µL dessa suspensão pura ou diluída 10 vezes em PBS (pH 7,2) estéril foi semeada em meio ágar-BHI suplementado com 5 % de SFB e 4 % de filtrado de cultura de *P. brasiliensis* (isolado 192). As placas foram mantidas em estufa à 37 °C e, as contagens das unidades formadores de colônia (UFC) foram feitas após 15 dias e expressas por mililitro.

4.2 Efeito da vacina (P10+DODAB) na PCM experimental: expressão de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 em neutrófilos de camundongos C57Bl/6, BALB/c e B10.A

4.2.1 Animais

Camundongos machos da linhagem C57Bl/6, BALB/c e B10.A, com idade entre 6 e 8 semanas, foram obtidos no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais foram mantidos sob condições descritas anteriormente na sessão 3.1.1, até o momento da realização dos experimentos.

4.2.2 Lipídeo catiônico DODAB

O lipídeo catiônico *dioctadecyl-dimethyllammonium bromide,* DODAB (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi preparado à uma concentração de 2 mM em solução de NaCl 1 mM. Posteriormente, foi sonicado (80-90 mW, 20 minutos, 70 °C) para assim adquirir fragmentos de camada dupla com diâmetro médio de 73 ± 1 nm e potencial zeta de 41 ± 3 mV. Uma vez o lipídeo sonicado, a solução foi centrifugada (2.000 xg por 30 minutos) e o sobrenadante foi diluído em solução de NaCl a 1 mM para assim

atingir a concentração adequada para ser usado como adjuvante durante as imunizações ou estímulos nos animais (Lincopan *et al.,* 2009).

4.2.3 Peptídeo P10

O peptídeo P10 (QTLIAIHTLAIRYAN) foi sintetizado e purificado por PEPTIDE 2.0, Inc. (Chantilly, EUA). O peptídeo foi solubilizado em ácido dimetilsufóxido de sódio (DMSO; Sigma-Aldrich, Alemanha) seguido da adição de PBS (pH 7,2) estéril, de modo a obter solução estoque de P10 a uma concentração final de 1 mg/mL com 20 % de DMSO. Esta solução estoque foi mantida a -20 °C por até seis meses.

4.2.4 Determinação de diâmetro, distribuição de tamanho, potencial zeta e polidispersão da associação P10/DODAB

O peptídeo P10 foi associado ao adjuvante DODAB de modo a obter a concentração final de 200 µg/mL e 0,1 mM, respectivamente. O solubilizante/diluente usado tanto para a associação ou para o DODAB foi NaCl a 1 mM. A associação P10/DODAB foi homogeneizada em vórtex e mantida em repouso a temperatura ambiente por 1 hora. P10 a uma concentração de 200 µg/mL e DODAB a 2 mM foram usados como controles. Após o período de incubação, o tamanho das partículas (média do diâmetro Dz), a distribuição de tamanho, a polidispersão e o potencial zeta dos complexos formados foram determinados utilizando o *ZetaPlus-ZetaPotential Analyzer* (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, EUA).

4.2.5 Condições in vitro

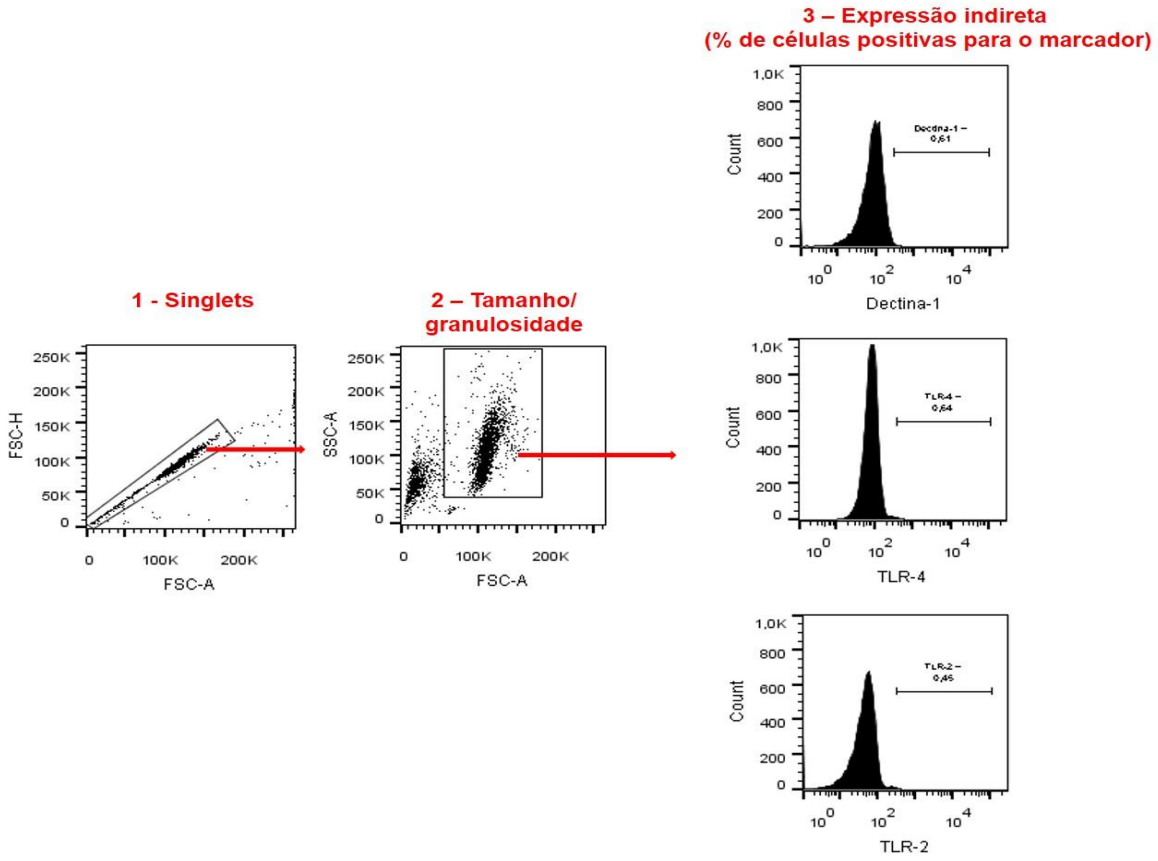
Neutrófilos murinos purificados (sessão 3.1.2) das linhagens descritas anteriormente, foram distribuídos em placas de cultura de 96 poços (5 x 10^5 células/poço) e estimulados ou não por 12 horas com P10 (100 µg/mL), DODAB (0,05 mM), P10+DODAB (100 µg/mL; 0,05 mM) ou rIFN-γ de camundongo (150 U/mL). As placas foram mantidas em estufa umidificada à 37 °C com 5% de CO_2 e o experimento realizado em triplicata para cada condição.

4.2.6 Expressão de TLR-2, TLR-4 e dectina-1 por citometria de fluxo

A placa de cultura contendo os neutrófilos, após 12 horas de estímulo, foi mantida sob gelo por 5 minutos. As células foram coletadas por aspiração e transferidas para tubos de citometria de fluxo (BD Bioscience) e centrifugadas à 300 xg por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi aliquotado em microtubo e mantido à -20 °C para posterior quantificação de citocinas. O *pellet* celular foi ressuspendido em PBS (pH 7,2) com 2% de soro fetal bovino (Tampão FACS, pH 7,4) e, contendo a seguinte combinação de anticorpos: anti-dectina-1 conjugado com PE (clone 218820; R&D systems, EUA) ou anti-TLR2 conjugado com PE (clone 6C2; eBioscience, EUA) e anti-TLR4 conjugado com FITC (clone MTS510; Imgenex, Índia). Todos os anticorpos foram utilizados em uma diluição final de 1:200 (0,5 µg/ 10^6 células). As células foram incubadas por 30 minutos à 4 ºC e protegidas da luz. Após esse período as células foram lavadas 2 vezes com tampão FACS (500 µL/tubo) e ressuspendidas em paraformaldeído (PFA) a 1% para serem analisadas no citômetro de fluxo Canto II (BD, EUA).

Um total de 50.000 eventos foram adquiridos por amostra. Como controles de compensação foram utilizados células não marcadas e beads (CompBeads anti-mouse Ig, k/negative control. BD Bioscience, EUA) marcadas com um anticorpo por vez. Controles “Fluorescence Minus One” (FMO) foram utilizados para definição dos limites de positividade. Os dados adquiridos foram analisados no software FlowJo (versão 10,TreeStar Inc., EUA) e as estatísticas em Prism 5.0 (GraphPad Inc, EUA) 5.0 (Graph Pad, EUA). A estratégia de análise utilizada está ilustrada a seguir (Figura 1).

Figura 1 - Estratégia para análise de expressão indireta de TLR-2, TLR-4 e dectina-1 em neutrófilos murinos.



4.3 Fagocitose e morte de *P. brasiliensis* por neutrófilos murinos estimulados com o peptídeo P10+DODAB na PCM experimental.

4.3.1 Marcação de leveduras de P. brasiliensis com FITC

Leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18), previamente crescidas em meio BHI por 7 dias, foram lavadas três vezes com PBS (550 xg/ 10 minutos, 25 °C) e 1 x 10^6 leveduras foi ressuspendida em 1 mL de tampão carbonato a 50 mM (pH 9,5) contendo 100 μg/mL de FITC (Sigma-Aldrich, Alemanha). As leveduras foram incubadas à 37 °C por 30 minutos, centrifugadas e então lavadas novamente com PBS (pH 7,2) por três vezes. O *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de DMEM e as leveduras foram contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi estimada usando o corante azul de Trypan. Posteriormente, a concentração desejada para o experimento foi ajustada.

4.3.2 Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo

Neutrófilos murinos de camundongos BALB/c (sessão 3.1.2) após 12 horas de estímulo (sessão 3.2.4) foram incubados por 4 horas com leveduras de *P. brasiliensis* (isolado Pb18) previamente marcadas com FITC. Após esse período as células foram lavadas com tampão FACS e marcadas com CD11b conjugada com V450 (0,5 µg/10^6 células; clone M1/70; BD, EUA) por 30 minutos à 4 °C. Posteriormente as células foram lavadas, fixadas com 1 % de PFA em PBS (pH 7,2) e analisadas no citômetro de fluxo Canto II (BD, EUA). Células duplo positivas para CD11b e FITC representam neutrófilos contendo leveduras fagocitadas e/ou aderidas a sua superfície. Para visualizar as leveduras realmente fagocitadas, foi realizada técnica de *queenching,* com azul de Trypan (250 µg/mL) para eliminar as leveduras apenas aderidas à superfície do neutrófilo. O total de 50.000 eventos foi analisado por amostra. A morte de *P. brasiliensis* pelos neutrófilos foi analisada após 24 de interação (sessão 3.1.4).

4.4 Modelo experimental *in vivo*

4.4.1 Animais

Camundongos da linhagem BALB/c, machos e com idade entre 6 e 8 semanas, foram mantidos nas condições descritas na sessão 3.1.1.

4.4.2 Grupos amostrais

Os camundongos foram divididos em 5 grupos: 1) não infectado; 2) infectado; 3) infectado e tratado com DODAB; 4) infectado e tratado com P10; 5) infectado e tratado com P10+DODAB. Cada grupo foi composto por um total de 6 animais. Em algumas análises os grupos 4 e 5 foram excluídos, uma vez que ficou demonstrado que P10 ou DODAB sozinho não tem qualquer efeito.

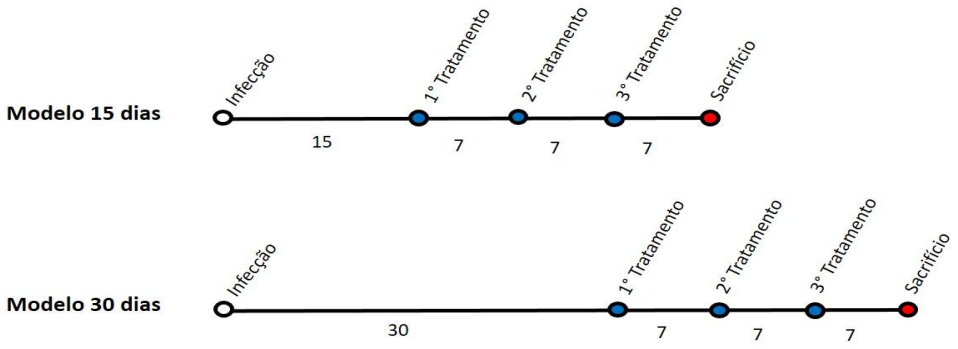
4.4.3 Infecção intratraqueal (i.t)

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com 300 uL de uma solução contendo a combinação de 80 mg/Kg de quetamina (União Química Farmacéutica, Brasil) e 10 mg/Kg de xilazina (União Química Farmaceutica, Brasil). Após constatação de que os animais apresentavam-se em estado de anestesia (entre 5 e 10 minutos), foi realizada uma pequena incisão longitudinal na face ventral do pescoço dos animais, de modo que, a traqueia ficasse exposta. Em seguida, com auxílio de pinça e seringa tuberculínica (1 mL de capacidade e com agulha 26G) foi injetado na traqueia 3 x 10^5 leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) em 50 µL de PBS (pH 7,2). A incisão foi suturada e os animais foram mantidos sob fonte moderada de calor devido a hipotermia transitória gerada pelo anestésico. O preparo do inóculo foi realizado como descrito na sessão 3.1.3.

4.4.4 Vacina terapêutica

Os camundongos, após 15 ou 30 dias de infecção, foram tratados com P10 (20 µg por animal), DODAB (0,1 Mm por animal) ou P10 associado ao DODAB (20 µg; 0,1 mM, respectivamente). O tratamento foi dividido em três doses, sendo uma por semana. A primeira dose foi administrada no coxim plantar e as outras doses foram injetadas por via subcutânea na base da cauda. Após 7 dias da última imunização os animais foram sacrificados. A esquematização dos modelos de 15 e 30 dias de infecção é sumarizada abaixo (Figura 2).

Figura 2 - Modelos experimentais



4.4.5 Determinação de carga fúngica pulmonar

Após 7 dias do último tratamento, os animais foram sacrificados e os pulmões foram excisados para análises diversas, entre elas carga fúngica. Os pulmões foram pesados, macerados em 2 mL de PBS (pH 7,2) estéril e 100 μL dessa suspensão foi semeada em meio ágar BHI (sessão 3.1.4). As placas foram incubadas à 37 ºC e após 7-15 dias as unidade formadoras de colônias foram contadas e o resultado expresso em UFC/g de tecido.

4.4.6 Histologia

Amostras de parte dos pulmões dos animais foram acondicionados em formalina tamponada a 10% (Merck, Alemanha) e enviadas para a Histocell (São Paulo, Brasil) para realização de coloração de hematoxilina/eosina e Tricômio de Masson (fibrose).

4.4.7 Quantificação das citocinas IL-10, IL-12, IL-4, TNF-α, IFN-γ, MCP-1, GM-CSF, IL-17, IL-23 e IL-1β

A quantificação de algumas citocinas presentes nos pulmões foi avaliada por ELISA de captura, utilizando-se kit comercial da BD Bioscience (EUA) ou da eBioscience (EUA) de acordo com as instruções dos fabricantes. A amostra foi obtida do macerado pulmonar diluído em 1 mL de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, Alemanha). A amostra foi então centrifugada (500 xg/ 5 minutos), o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C até o momento das análises.

Os ensaios, tanto da BD quanto da eBioscience, foram revelados com TMB (BD, EUA) por 30 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz. A reação foi bloqueada com H_2SO_4 2N, e as leituras foram feitas a 450 nm de comprimento de onda (EPOCH, EUA). Os limites de detecção das citocinas dos kits da BD bioscience foram: 7,8 pg/mL (IL-4); 31,25 pg/mL (IL-10); 31,25 pg/mL (IFN-γ); 15,6 pg/mL (TNF-α); (MCP-1); 7,8 pg/mL (GM-CSF) 7,8 pg/mL (IL-12). Os limites para o kit da eBioscience foram: 30 pg/mL para IL-17, 8 pg/mL para IL-23 e 16 pg/mL para IL-1β. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.4.8 Quantificação de leucotrieno B_4

A determinação de leucotrieno B4 (LTB_4), nos pulmões dos animais, foi determinada através de ensaio comercial imunoenzimático de competição segundo recomendações do fabricante (Cayman Chemical Company, EUA). O limite de detecção para LTB_4 foi de 13 pg/mL. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.4.9 Determinação de neutrófilos nos pulmões por citometria de fluxo

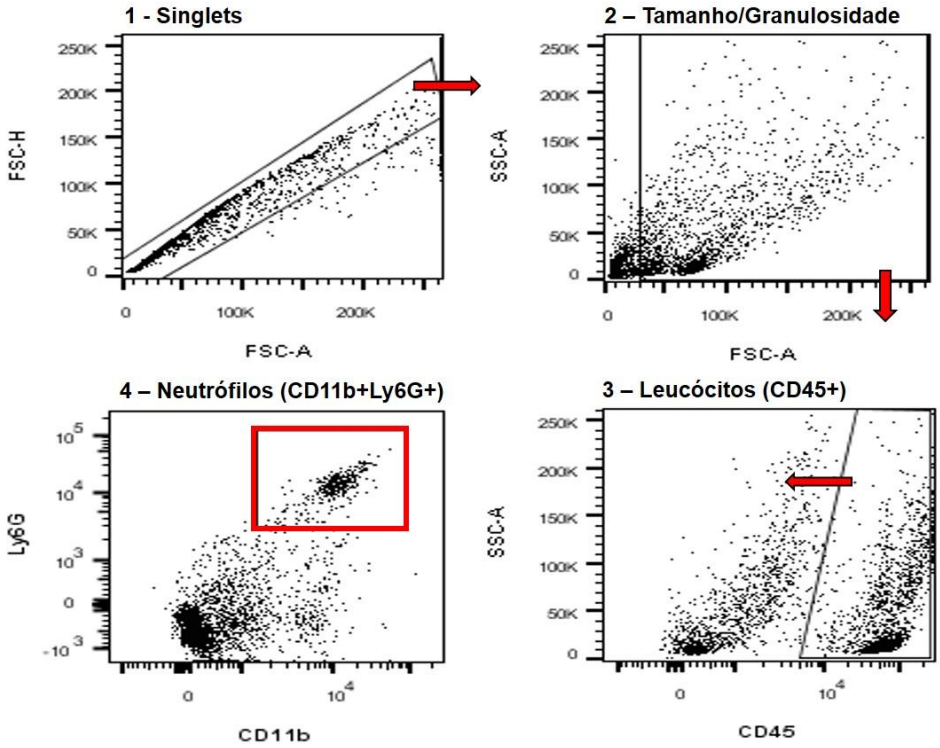
Camundongos infectados por 15 ou 30 dias e tratados com P10+DODAB foram analisados quanto à presença de neutrófilos nos pulmões por citometria de fluxo. A obtenção de suspensão celular a partir do pulmão foi realizada segundo já descrito na literatura (Amaral *et al.,* 2014). Brevemente, após eutanização dos animais em câmara de CO_2, os pulmões foram excisados, lavados com PBS (pH 7,2) e fracionados em pedaços de 1 mm. Os fragmentos gerados foram incubados com 6 mL de solução de digestão (meio RPMI simples com colagenase a 0,5 mg/mL) a 37 °C sob agitação (200 rpm) por 45 minutos. A reação foi parada com 1 mL de SFB inativado por calor, e as células foram dispersas com auxílio de seringa de 10 mL e agulha com calibre 18G. Em seguida, as células foram passadas em *cell strainer* de 100 µm e centrifugadas a 300 xg por 10 minutos à 4 °C. As hemácias foram lisadas com NaCl a 0,2 e 1,6%, e as células foram ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e gentaminicina (10 µg/mL). A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi analisada por meio do azul de Trypan.

Um total de 3×10^6 células foram utilizadas para a marcação de citometria de fluxo. As células foram lavadas com tampão FACS e então incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente com 20 µL de tampão FACS contendo *Fc Block* (clone 2.4G2; BD, EUA). Posteriormente, foi adicionado 25 µL de tampão FACS contendo os seguintes anticorpos: anti-CD45 conjugado com PE (clone 30-F11; BD, EUA), anti-CD11b conjugado com AlexaFluor 700 (clone M1/70; eBioscience, EUA) e anti-Ly6G conjugado com PerCP-Cy5.5 (clone 1A8; BD, EUA). As células foram

incubadas por 30 minutos à 4 °C, lavadas duas vezes com tampão FACS e fixadas com PFA a 1 % em PBS (pH 7,2).

As amostras foram lidas no citômetro Fortessa LSR (BD, EUA), adquirindo o total de 50.000 eventos por amostra. Como controles de compensação foram usados células não marcadas e *beads*. Controles FMOs foram usados para determinação de positividade real. Os dados adquiridos foram analisados no software FlowJo (versão 10,TreeStar Inc., EUA) e a avaliação estatística no software Prism 5.0 (GraphPad Inc, EUA). Cada anticorpo foi previamente titulado e usado o fator de diluição que variou entre 1:100 e 1:400 (0,5 µg/ 10^6 células). Em virtude dos experimentos anteriores, não foi preciso incluir os grupos tratados apenas com DODAB ou P10. A estratégia de análise pode ser visualizada na Figura 3.

Figura 3 - Estratégia de análise para imunofenotipagem de neutrófilos no pulmão.



A suspensão celular obtida após digestão enzimática dos pulmões foi analisada por citometria de fluxo na seguinte ordem: 1 – Exclusão de células duplo ligadas (FSC-H vs FSC-A); 2 - Exclusão de *debris* (FSC-A vs SSC-A); 3 – Seleção positiva para marcação de CD45 (leucócitos); 4 – duplo marcação para CD11b e Ly6G (neutrófilos).

4.4.10 Imunofluorescência para avaliação de NETs nos pulmões

A análise de indicativos de formação de NETs foi avaliado em tecido pulmonar parafinado de camundongos não infectados, infectados e infectados tratados com P10+DODAB. Brevemente, cortes (5 a 7 μm) de amostras de tecido pulmonar foram desparafinadas, rehidratadas e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,025 % em solução tampão de Tris (TBS, pH 7,2) por 10 minutos. As amostras foram então bloqueadas com TBS contendo 3 % de albumina sérica bovina (BSA) por 1 hora, seguida de incubação *overnight* à 4 °C com TBS contendo anticorpo anti-Histona H2B conjugado com AlexaFluor 488 (Bioss, EUA) e anti-elastase neutrofílica conjugado com AlexaFluor 647 (Bioss, EUA), diluídos a 1:100. As amostras foram lavadas 3 vezes com TBS e incubadas por 20 minutos com *Hoescht 33342* a 0,5 % (Immunochemistry Technologies, EUA) para observação do núcleo das células. Em seguida, as lâminas foram montadas em n-propil galato e analisadas no microscópio de fluorescência (EVOS fl, AMG, EUA). Em virtude dos experimentos anteriores, não foi preciso incluir os grupos tratados apenas com DODAB ou P10.

4.5 Modelo *in vivo* com depleção neutrofílica transitória

4.5.1 *Obtenção do anticorpo anti-Gr1*

O anticorpo anti-Gr1, utilizado para depleção de neutrófilos, foi produzido *in vitro* através da purificação do sobrenadante de cultura do hibridoma RB6/8C5 através de proteína A/G (Thermo Fischer Scientific, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O anticorpo foi diluído em PBS (pH 7,2) contendo 1 % de BSA e quantificado através do equipamento NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, EUA).

4.5.2 Determinação da dose de anticorpo anti-Gr1

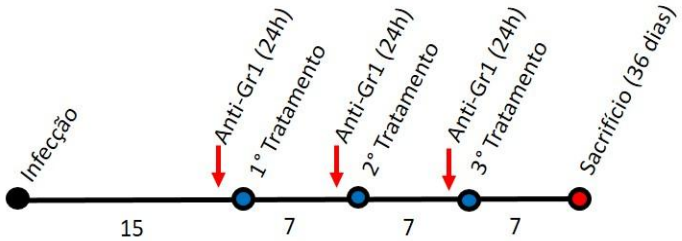
A determinação da quantidade de anticorpo a ser usado, foi realizada por administrar diferentes doses (200, 250 e 300 μg) do anticorpo por via intraperitoneal em camundongos BALB/c. Após 24 horas, o sangue do plexo retro-orbital (300 μL) foi coletado, seguido de confecção de esfregaço sanguíneo e coloração

hematológica diferencial com o kit comercial Instant Prov (NewProv, Brasil). A dose adequada foi aquela capaz de induzir a depleção por 48 horas em 80-90 % dos neutrófilos presentes no sangue e, sem afetar outras populações hematológicas.

4.5.3 Indução de depleção neutrofílica transitória

Camundongos BALB/c infectados por 15 dias com Pb18 receberam por via intraperitoneal 200 μg de anticorpo anti-Gr-1, 24 horas antes de cada tratamento com a vacina terapêutica (P10+DODAB), totalizando três doses (uma por semana). Grupo infectado e não tratado com a vacina foi usado como controle. Anticorpo irrelevante da mesma classe que o anti-Gr-1 (IgG2b; BD, EUA) foi usado como controle, sendo aplicado em camundongos não infectados, infectados e infectados/tratados. Após 7 dias da último tratamento vacinal, os animais foram sacrificados e os pulmões foram avaliados (carga fúngica, histologia, citocinas e LTB_4). Em virtude dos experimentos anteriores, não foi preciso incluir os grupos tratados apenas com DODAB ou P10. Segue abaixo o esquema desse modelo experimental (Figura 4).

Figura 4 - Esquema do protocolo de depleção neutrofílica transitória



4.6 Linfoproliferação *ex vivo*

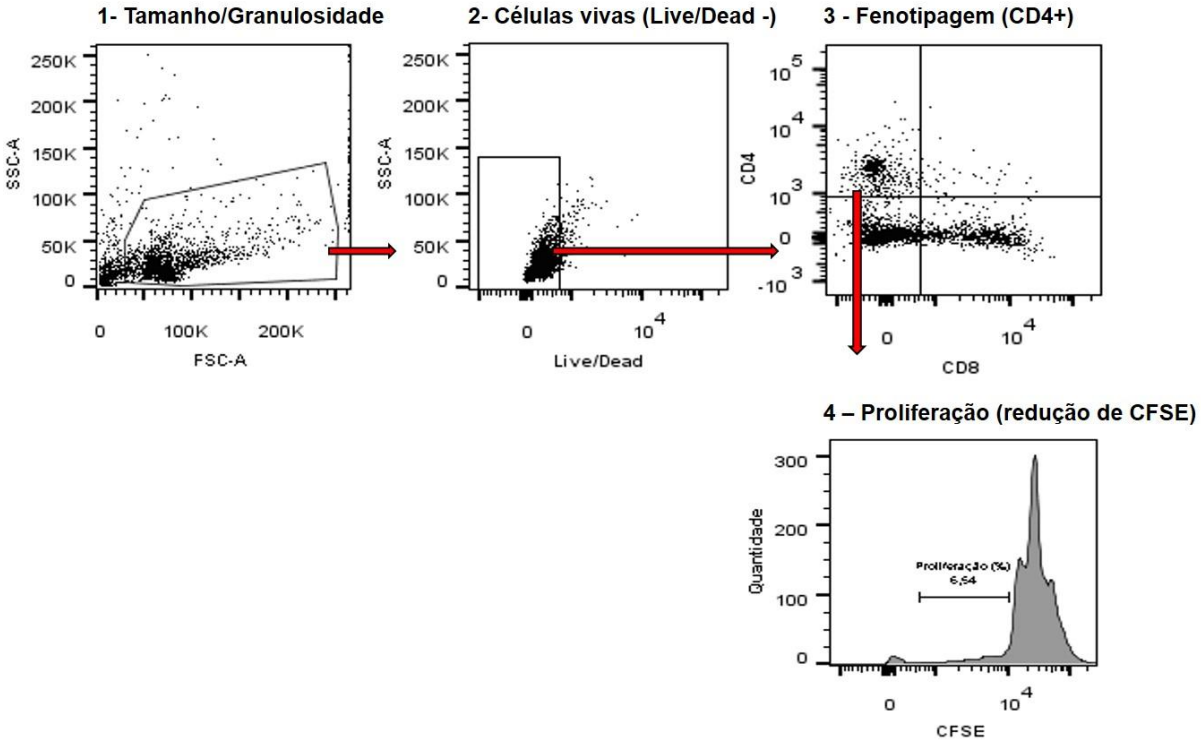
Esplenócitos de camundongos do grupo não infectados, infectados ou infectados e tratados com a vacina, segundo modelo de 15 dias, foram extraídos para realização de ensaio de linfoproliferação. Brevemente, os baços foram retirados e macerados suavemente em 2 mL de meio RPMI. O macerado foi filtrado usando

cell strainer de 100 μm e transferido para tubos cônicos de 15 mL estéreis. Após centrifugação (300 xg/ 10 minutos à 4 °C), as hemácias foram lisadas usando NaCl a 0,2 % e 1,6 %. O *pellet* celular foi ressuspendido em 2 mL de meio RPMI e as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade foi avaliada por azul de Trypan. Um total de 10^7 células foram então marcadas com 5 μM de *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester* (CFSE) por 10 minutos a temperatura ambiente. A marcação foi interrompida com SFB gelado e as células foram lavadas e novamente contadas.

Posteriormente, 3 x 10^5 esplenócitos/poço foram distribuídos em placa de 96 poços com fundo em "U" contendo os seguintes estímulos/condições: (1) meio de cultura (controle negativo); (2) 4 μg/mL de concanavalina A (ConA; controle positivo); (3) P10 (10 μg); (4) Neutrófilos; (5) Neutrófilos estimulados com a vacina por 2 horas; (6) Neutrófilos estimulado com a vacina por 12 horas. O volume final de cada poço foi de 200 μL e as placas foram incubadas por 96 horas à 37 °C em estufa de CO_2 umidificada. Os neutrófilos foram obtidos da medula óssea de camundongos não infectados e foram estimulados como descrito na sessão 4.2.5. A proporção entre neutrófilos e linfócitos foi de 1:3. Após 96 horas de incubação, as células foram lavadas e marcadas com os anticorpos (0,5 µg/ 10^6 células) anti-CD4 conjugado com PerCP (clone RM4-5; BD, EUA) e anti-CD8 conjugado com PE-Cy7 (clone 56-6-7; BD, EUA) por 30 minutos à 4 °C. As células foram novamente lavadas, fixadas com PFA a 1% e lidas no citômetro Fortessa LSR (BD, EUA).

A estratégia de análise pode ser visualizada na Figura 5 abaixo. Controles adicionais foram usados: células não marcadas com CFSE e não estimuladas (definição do limite inferior do intervalo de proliferação); células não marcadas com CFSE e estimuladas com ConA (controle de autofluorescência induzida por proliferação); FMOs (definição de populações CD4 e CD8 e interferência de cores). Os dados obtidos foram analisados por FlowJo (versão 10,TreeStar Inc., EUA) (TreeStar, EUA) e as estatísticas foram feitas em Prism 5.0 (GraphPad Inc, EUA) (GraphPad, EUA).

Figura 5 - Estratégia de análise de linfoproliferação por citometria de fluxo.



Os esplenócitos, após 72 horas de incubação em distintas condições, foram avaliados quanto a linfoproliferação por citometria de fluxo. As células foram selecionadas na seguinte sequência: 1 - tamanho e granulosidade (células pequenas e de baixa granulosidade); 2- Viabilidade (*Live/Dead (viva/morta)* negativa); 3 - Marcação para CD4+ (linfócitos T CD4+). As células CD4+ foram avaliadas quanto a proliferação por analisar a perda de fluorescência para o corante CFSE.

4.7 Análise estatística

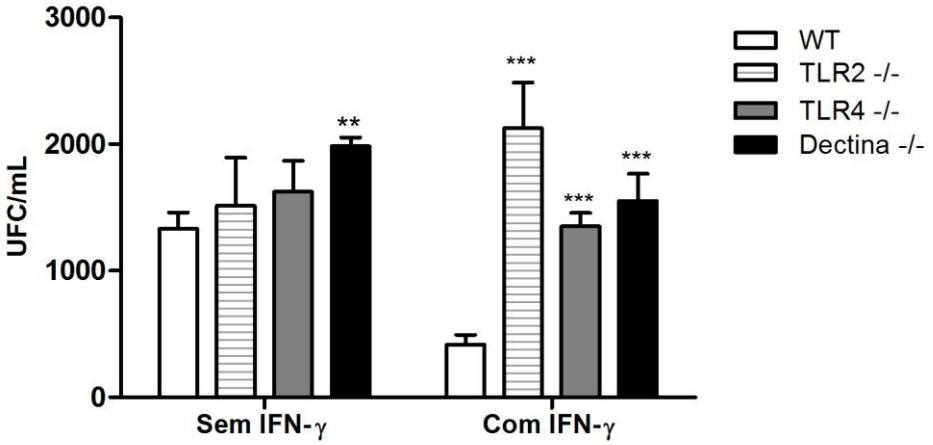
Os resultados foram analisados utilizando-se o software estatístico Prism 5.0 (GraphPad Inc, EUA), sendo realizado análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. O resultado foi considerado significativo quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Participação de TLR-2, TLR-4 e dectina-1 na atividade de morte de neutrófilos murinos contra *P. brasiliensis*

Inicialmente questionamos a participação dos receptores de reconhecimento padrão, descritos como sendo importante na PCM, como TLR-2, TLR-4 e dectina-1, estavam envolvidos na morte das leveduras de *P. brasiliensis* por neutrófilos murinos. Nesse sentido, observamos *in vitro* que na ausência do estímulo de ativação, como o IFN-γ, dectina-1 parece ser importante receptor relacionado à morte de *P. brasiliensis* por neutrófilos. Quando essas células são estimuladas, com IFN-γ, todos os três receptores padrões citados, parecem estar envolvidos no processo de morte do fungo (Figura 6).

Figura 6 - Envolvimento diferencial de TLR-2 e Dectina-1 na morte de *P. brasiliensis* por neutrófilos murinos.



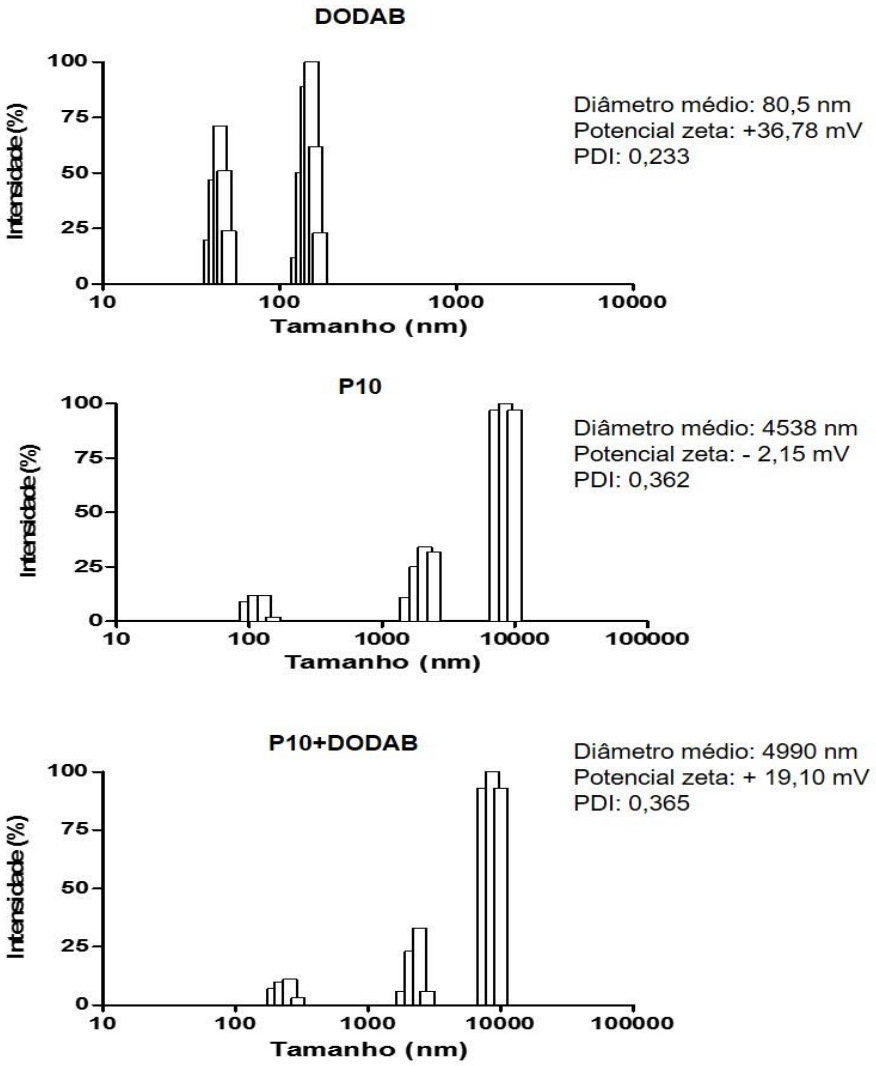
Neutrófilos murinos de camundongos C57Bl/6 selvagens (WT) ou nocautes para TLR-2 (TLR2-/-), TLR-4 (TLR4-/-) ou Dectina-1 (Dectina-/-) foram estimulados ou não com IFN-γ por 12 horas e depois incubados com leveduras de *P. brasiliensis* (isolado Pb18) por 24 horas. Diferenças estatísticas comparadas ao neutrófilo selvagem (WT): p**≤ 0,01 e p*** ≤ 0,001.

5.2 Avaliação de tamanho, potencial zeta e polidispersão da associação entre o peptídeo P10 e o lipídeo catiônico DODAB

O peptídeo P10 e o lipídeo catiônico DODAB, assim como sua associação, foram avaliados quanto ao tamanho, o potencial zeta (carga) e polidispersão. Nós

observamos que o peptídeo P10 foi capaz de associar-se ao DODAB, o que pode ser deduzido em virtude do tamanho do complexo formado (4990 nm) ser maior do que o P10 (3784,5 nm) quando analisados separadamente (Figura 7). O DODAB apresentou caráter catiônico (+36,78 mV), enquanto que o peptídeo P10 foi aniônico (-2,15 mV). Já a carga da associação P10+DODAB é catiônica (+ 19,10 mV). Entretanto, Não observamos alteração de polidispersão no complexo P10+DODAB.

Figura 7 - Distribuição de tamanho, potencial zeta (carga) e polidispersão (PDI) do peptídeo P10 associado ou não com o lipídeo catiônico.



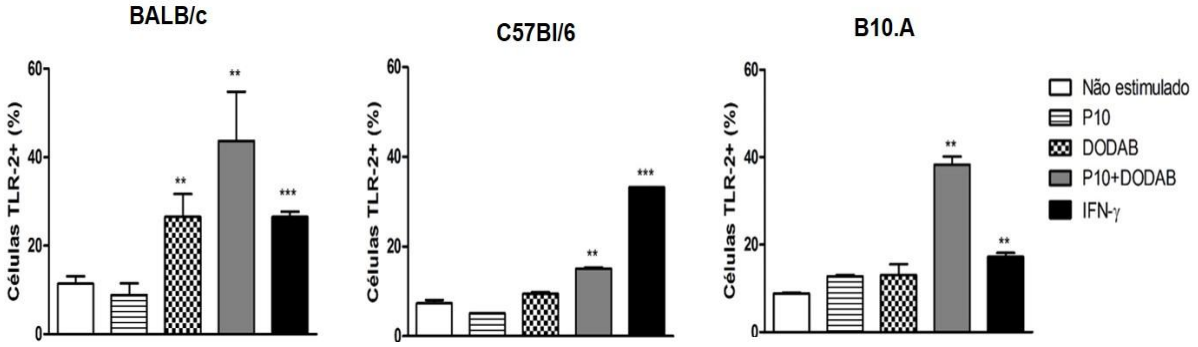
As medidas foram obtidas após uma hora de interação entre DODAB e P10, utilizando-se solução de força iônica baixa (NaCl 1 mM). As medições foram feitas no Zeta Potential Analyzer Brookhaven Instruments. Para cada ensaio foi usado o volume de 1,5 mL. Cada medida corresponde a uma medida de 10 medições ± o desvio padrão.

5.3 Subpopulações de neutrófilos: expressão de receptores TLR-2, TLR-4 ou dectina-1 quando estimulados com a formulação vacinal P10 + DODAB

Em experimento anterior (sessão 5.1) observamos que receptores TLR-2, TLR-4 e dectina-1 estavam envolvidos na morte de *P. brasiliensis* por neutrófilos murinos, particularmente na presença do estímulo de ativação (IFN-γ). Considerando esse resultado, avaliamos se a formulação vacinal contra PCM – peptídeo P10 associado ao adjuvante DODAB – poderia induzir a expressão desses receptores em três diferentes linhagens de camundongos: BALB/c, C57Bl/6 e B10.A. O critério de escolha dessas linhagens foi por conta que as mesmas apresentam padrões distintos de suscetibilidade/resistência a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*, sendo BALB/c intermediário mais para resistente, C57Bl/6 intermediário mais para suscetibilidade e B10.A (Calich *et al.,* 1985).

Nós observamos que a vacina induz a expressão TLR-2 de modo similar em BALB/c (43 %) e B10.A (38 %). Entretanto, em C57Bl/6 (18 %) a expressão é menos pronunciado. É importante destacar que IFN-γ teve efeito diferencial sobre as linhagens murinas, onde BALB/c e C57Bl/6 respondem de modo igual e B10.A sofre efeito mais discreto (Figura 8).

Figura 8 - Expressão de TLR-2 em neutrófilos de camundongos das linhagens BALB/c, C57Bl/6 e B10.A, estimulados com a vacina P10+DODAB.

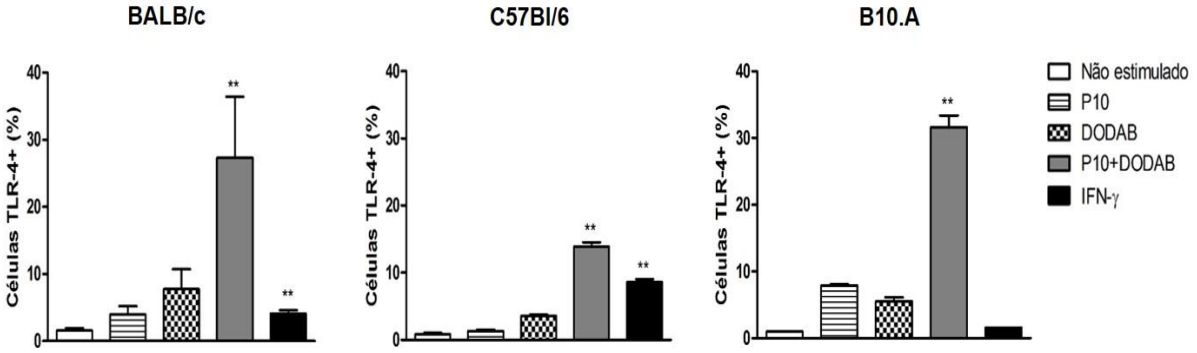


Neutrófilos obtidos de medula óssea das três linhagens foram estimulados por 12 horas coma formulação vacinal (P10+DODAB) ou seus componentes individuais (P10 e DODAB) e então submetidos a citometria de fluxo para análise de expressão de TLR-2. Como controle foram utilizados neutrófilos estimulados ou não com interferon-γ (IFN-γ)**.** Diferenças estatísticas comparadas ao controle não estimulado são indicadas: p*≤ 0,05, p**≤ 0,01 e p*** ≤ 0,001.

Em relação à expressão de TLR-4, observamos resultado muito similar ao obtido com TLR-2. Isto é, a vacina foi capaz de induzir a expressão de TLR-4 em

neutrófilos das linhagens BALB/c (28 %) e B10.A (32 %) e com menos intensidade em C57Bl/6 (14 %). O efeito do IFN-γ também foi muito parecido com o obtido para TLR-2, mas com aumentos menores, com exceção de B10.A, onde não foi observado qualquer aumento de expressão do receptor (Figura 9).

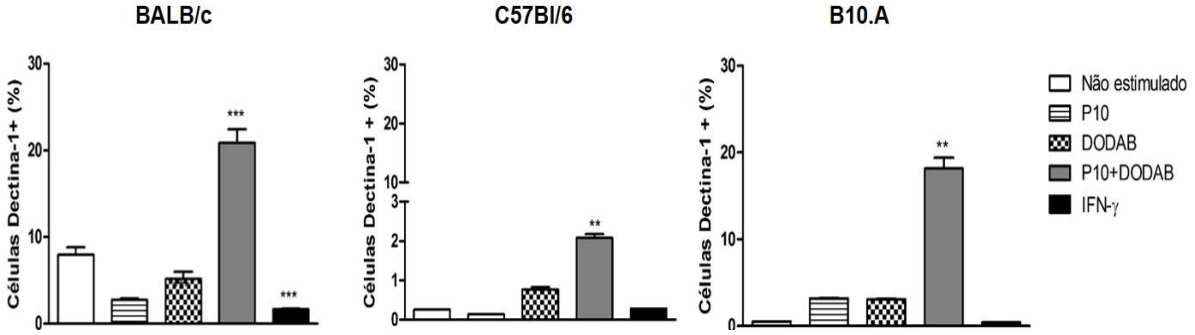
Figura 9 - Expressão de TLR-4 em neutrófilos de camundongos das linhagens BALB/c, C57Bl/6 e B10.A, estimulados com a vacina P10+DODAB.



Neutrófilos obtidos de medula óssea de três linhagens foram estimulados por 12 horas com a formulação vacinal (P10+DODAB) ou seus componentes individuais (P10 e DODAB) e então submetidos a citometria de fluxo para análise de expressão de TLR-4. Como controle foram utilizados neutrófilos estimulados ou não com interferon-γ (IFN-γ). Diferenças estatísticas comparadas ao controle não estimulado são indicadas: p*≤ 0,05, p**≤ 0,01 e p*** ≤ 0,001.

A avaliação da expressão de dectina-1 mostrou efeito similar com aqueles obtidos com TLR-2 e TLR-4. A vacina foi capaz de aumentar a expressão de dectina-1 em neutrófilos das linhagens BALB/c (22 %) e B10.A (18 %). Em C57Bl/6 o efeito foi bem discreto. O estímulo com IFN-γ não induziu a expressão de dectina-1 em neutrófilos das linhagens C57Bl/6 e B10.A. Em BALB/c, foi observado redução de expressão (Figura 10).

Figura 10 - Expressão de dectina-1 em neutrófilos de camundongos das linhagens BALB/c, C57Bl/6 e B10.A, estimulados com a vacina P10+DODAB.



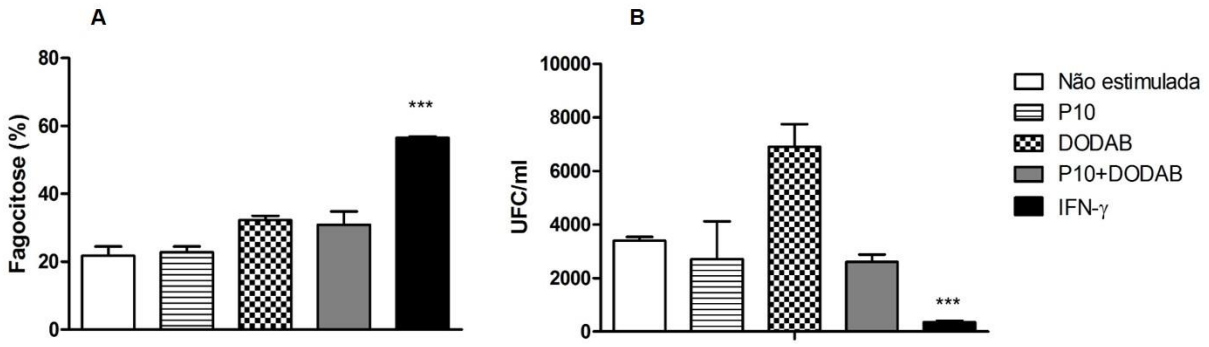
Neutrófilos obtidos de medula óssea das três linhagens foram estimulados por 12 horas coma formulação vacinal (P10+DODAB) ou seus componentes individuais (P10 e DODAB) e então submetidos a citometria de fluxo para análise de expressão de dectina-1. Como controle foram utilizados neutrófilos estimulados ou não com interferon-γ (IFN- γ)**.** Diferenças estatísticas comparadas ao controle não estimulado são indicadas: p*≤ 0,01, p**≤ 0,001 e p*** ≤ 0,0001.

5.4 Efeito da vacina (P10+DODAB) na PCM experimental: atividade sobre a fagocitose e morte de *P. brasiliensis* por neutrófilos murinos.

A maioria dos experimentos em camundongos realizados em nosso laboratório focado no desenvolvimento de vacinas, foram realizados com a linhagem de camundongos BALB/c. Para ter um bom parâmetro de comparação resolvemos investigar mais profundamente o efeito da vacina sobre neutrófilos de camundongos BALB/c. Mais especificamente, estávamos interessados em investigar a atividade de neutrófilos estimulados com a vacina na fagocitose e morte intracelular.

Observamos que neutrófilos murinos de camundongos BALB/c, estimulados com a vacina, não apresentam alterações na sua capacidade de fagocitar e matar *P. brasiliensis.* Por outro lado, o estímulo direto com IFN- γ, levaram os neutrófilos a fagocitar e matar com mais eficiência quando comparado ao controle não estimulado (Figura 11).

Figura 11 - Fagocitose e morte de *P. brasiliensis* por neutrófilos estimulados com a vacina (P10+DODAB).

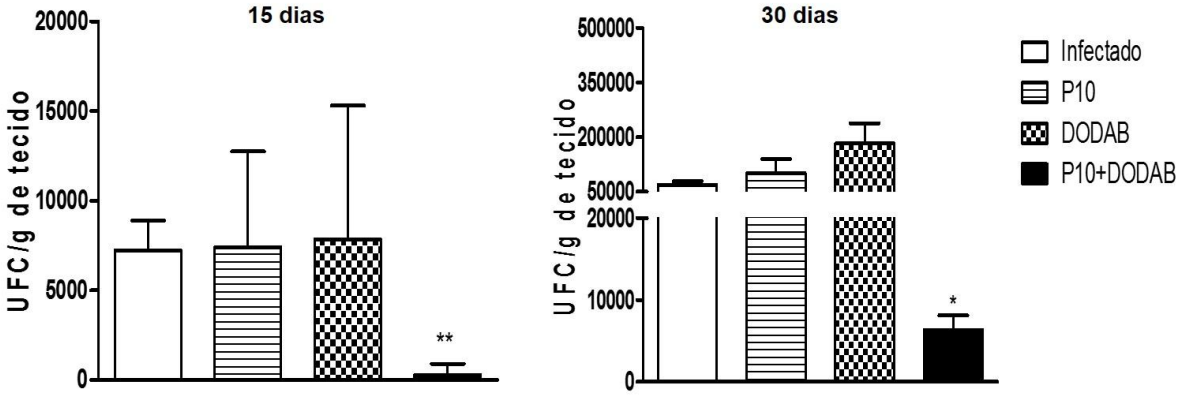


Neutrófilos murinos obtidos da medula óssea de linhagem de camundongos BALB/c foram estimulados por 12 horas com o peptídeo P10 e/ou o lipídio catiônico DODAB. Após esse período, os neutrófilos foram incubados com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) por 4 ou 24 horas para avaliação da fagocitose (A) e morte (B), respectivamente. Como controle foram utilizados células estimuladas ou não com IFN-γ. Diferenças estatísticas comparadas ao controle não estimulado são indicadas: p*** ≤ 0,0001.

5.5 Modelo terapêutico com 15 ou 30 dias de infecção: carga fúngica pulmonar

Camundongos da linhagem BALB/c infectados com *P. brasiliensis* (Pb18) por 15 ou 30 dias e tratados com a vacina terapêutica (P10+DODAB), foram sacrificados 7 dias após o último tratamento e a carga fúngica nos pulmões foi avaliada. Observamos que houve uma menor carga fúngica nos pulmões daqueles animais que foram tratados com a vacina em ambos os modelos terapêuticos de 15 e 30 dias, como pode ser demonstrado pela recuperação de UFC/g de tecido. O tratamento realizado apenas com o peptídeo P10 sozinho ou com o adjuvante DODAB foram utilizados como controle e não tiveram quaisquer efeitos quando comparado com o grupo infectado (Figura 12).

Figura 12 - Carga fúngica nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.

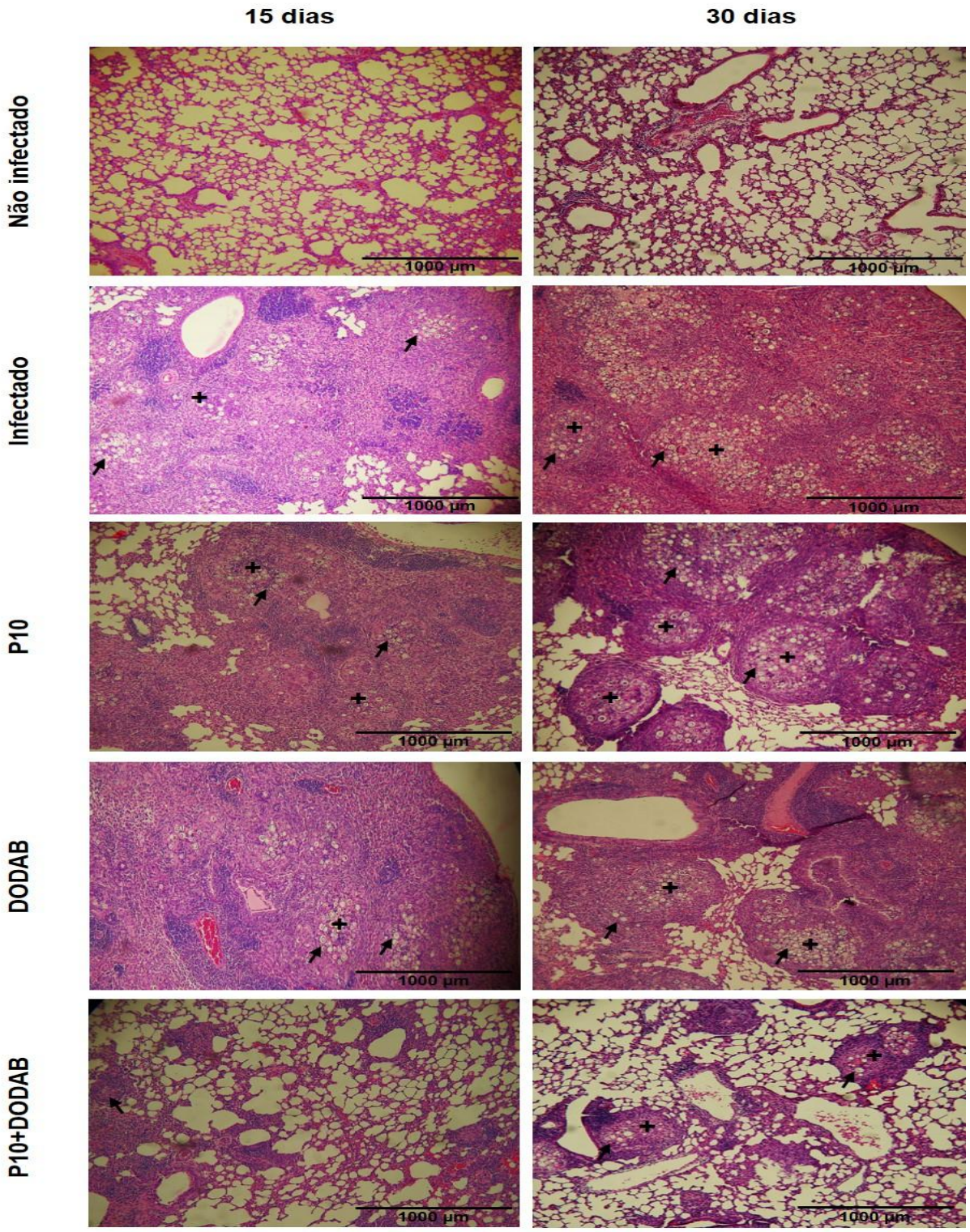


Camundongos BALB/c foram infectados com a cepa virulenta de *P. brasiliensis* (Pb18) e após 15 ou 30 dias foram tratados com a vacina terapêutica. Após 7 dias do último tratamento, os animais foram sacrificados e a carga fúngica dos pulmões foi avaliada pela recuperação de UFC. Diferenças estatísticas comparada ao controle não estimulado são indicadas: $p^* \leq 0,05$ e $p^{**} \leq 0,01$.

5.6 Modelo terapêutico com 15 ou 30 dias de infecção: Análise histológica

A análise histológica dos pulmões, por coloração de hematoxilina e eosina, revelou que animais infectados e tratados com a vacina apresentaram tecido pulmonar mais preservado com poucas áreas de inflamação contendo fungo e granulomas menores e mais compactos. Em contraste, animais infectados e tratados ou não com DODAB ou P10 tiveram pulmões com extensas áreas inflamadas com leveduras abundantes (Figura 13).

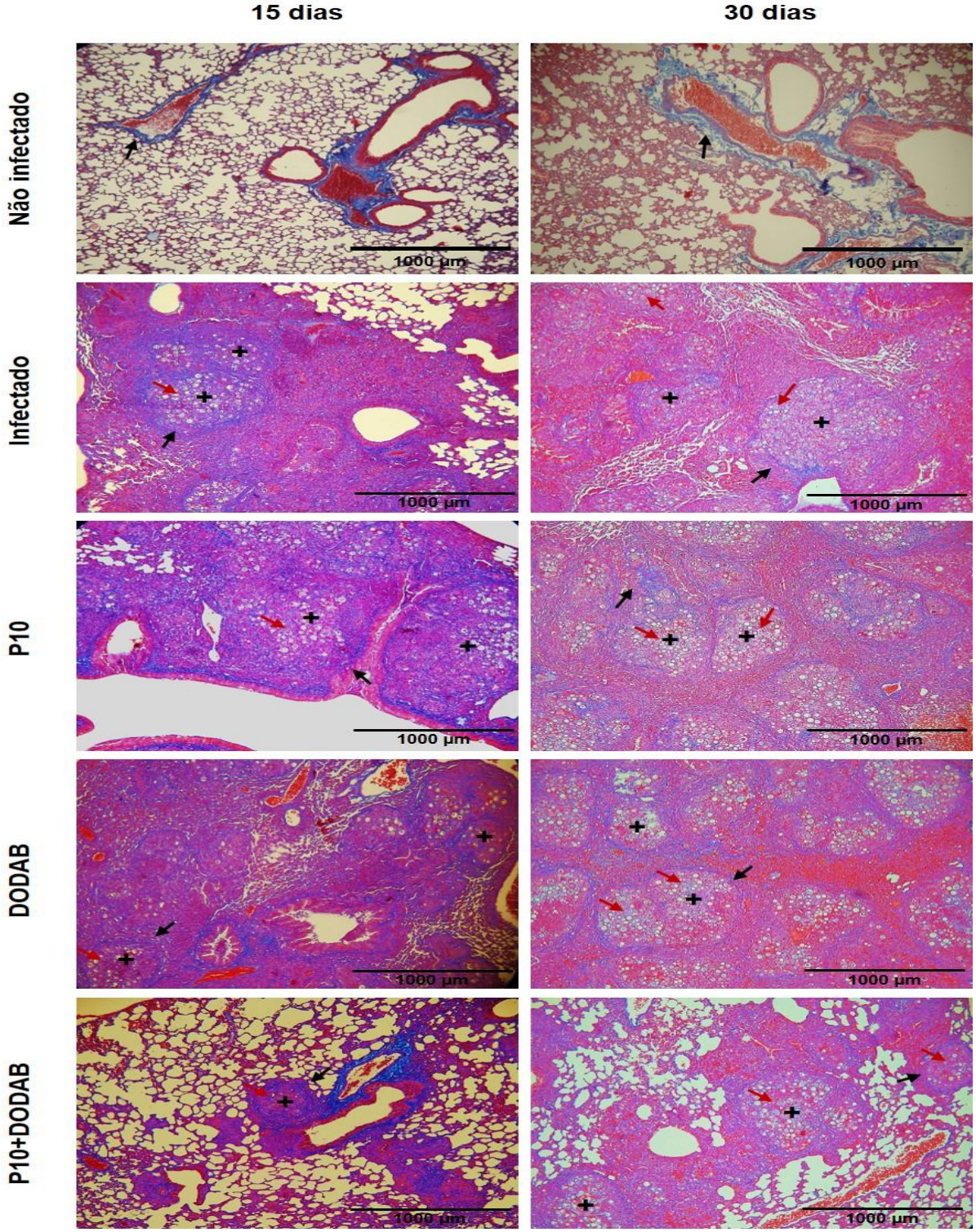
Figura 13 - Análise histológica nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.



Camundongos BALB/c após 15 ou 30 de infecção com isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18), foram tratados com a vacina terapêutica. Após 7 dias do último tratamento, os animais foram sacrificados e os pulmões foram processados e corados com hematoxilina e eosina. As setas indicam leveduras e as cruzes áreas de granulomas. Aumento de 100 x.

A avaliação de fibrose nos pulmões foi realizada por coloração tricômio de Massom, que revela a presença de fibras de colágeno do tipo I que são evidenciadas pela cor azul. A análise tanto do modelo de 15 quanto do de 30 dias, após a infecção, revelou a presença de fibras de colágeno do tipo I nos pulmões de animais infectados e tratados ou não com P10 ou DODAB. Essas fibras, em sua maioria, estavam dispostas em volta de granulomas contendo leveduras em abundância. Já os pulmões dos animais que foram infectados e tratados com a vacina terapêutica (P10+DODAB) indicando tecido pulmonar com poucos granulomas e reduzida presença de fibras de colágeno do tipo I (Figura 14).

Figura 14 - Análise de fibrose nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.

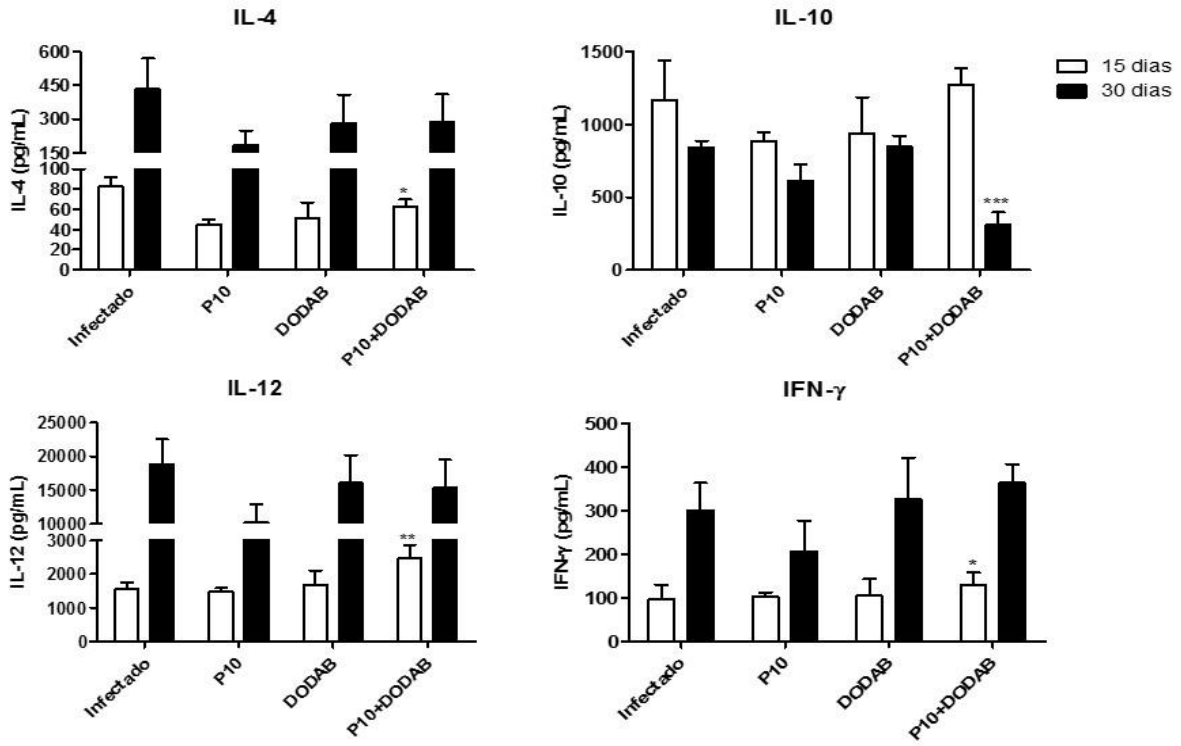


Camundongos BALB/c após 15 ou 30 de infecção com isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18), foram tratados com a vacina terapêutica. Após 7 dias do último tratamento, os animais foram sacrificados e os pulmões foram processados e corados por tricômio de Massom. As setas pretas indicam fibras de colágeno do tipo I (azuis), as setas vermelhas apontam leveduras (áreas não coradas e arredondas) e as cruzes áreas de granulomas. Aumento de 100 x.

5.7 Modelo terapêutico com 15 ou 30 dias de infecção: Perfil de citocinas

Animais infectados com *P. brasiliensis* por 15 ou 30 dias foram tratados com três doses da vacina terapêutica. Após 7 dias da última dose os animais foram sacrificados e o perfil de citocinas nos pulmões foi avaliado. Nós observamos que os animais infectados e tratados com a vacina do modelo de 15 dias apresentaram redução de IL-4 e aumento de IL-12 e IFN-γ, quando comparados com o grupo infectado. Já no modelo de 30 dias só observamos redução nos níveis de IL-10 nos animais infectados e tratados com a vacina (Figura 15).

Figura 15 - Quantificação das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e IFN-γ nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.

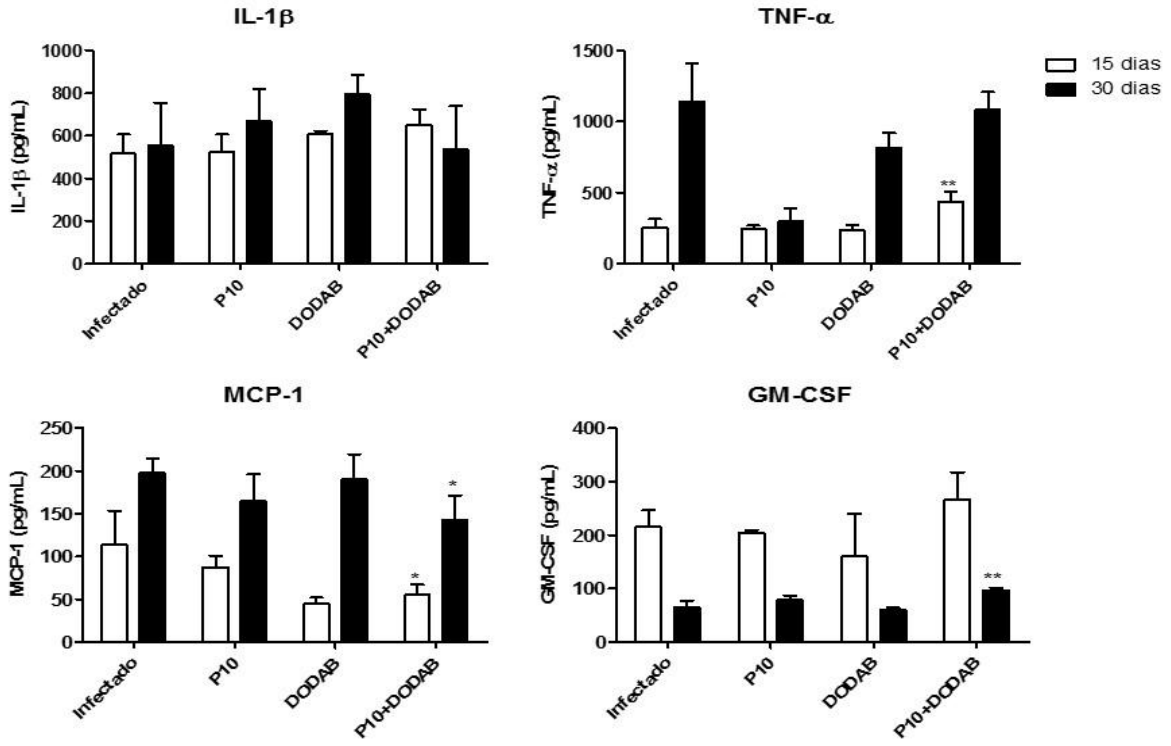


Camundongos foram infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com três doses da vacina terapêutica. Após 7 dias do último tratamento, os animais foram sacrificados e o perfil de citocinas nos pulmões foi avaliado por kit comercial de ELISA. Diferenças estatísticas comparadas ao controle infectado são indicadas: p*≤ 0,01, p**≤ 0,005 e p***≤ 0,0001.

Nós avaliamos algumas citocinas que estão envolvidas no processo inflamatório e/ou recrutamento de células para o local da infecção. Entre estas

citocinas dosamos: IL-1β, GM-CSF, MCP-1 e TNF-α. No modelo de 15 dias, nós observamos que os animais tratados com a vacina apresentaram aumento nos níveis de TNF-α e redução da quimiocina MCP-1, quando comparadas aos animais apenas infectados. Já no modelo de 30 dias, os animais tratados com a vacina apresentaram aumento de TNF-α e GM-CSF, e redução de MCP-1, quando comparado ao grupo controle infectado. Não observamos diferenças com relação a IL-1β (Figura 16).

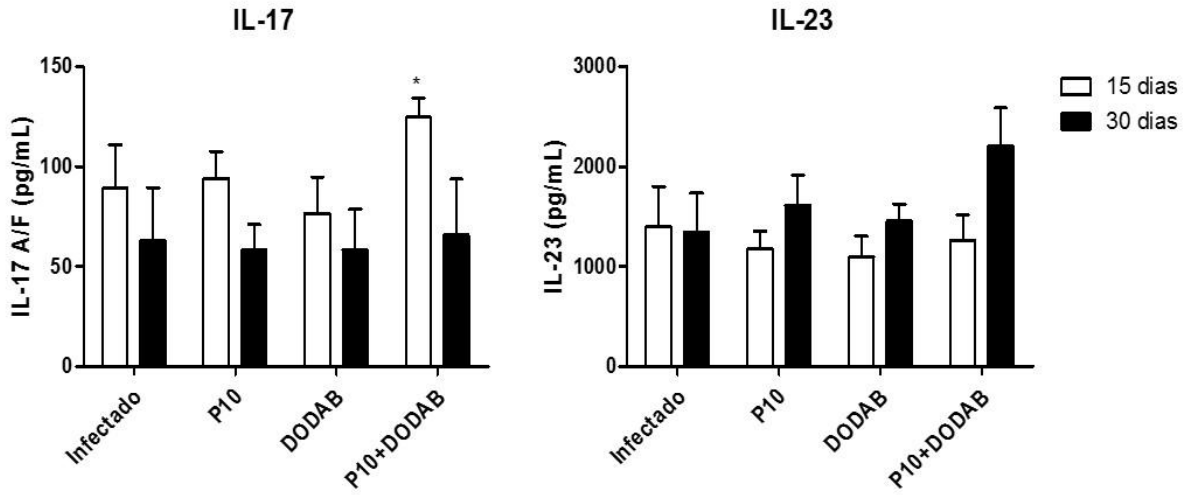
Figura 16 - Quantificação de IL-1β, TNF-α, GM-CSF e MCP-1 nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.



Camundongos foram infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com três doses da vacina terapêutica. Após 7 dias do último tratamento, os animais foram sacrificados e o perfil de citocinas nos pulmões foi avaliado por kit comercial de ELISA. Diferenças estatísticas comparadas ao controle infectado são indicadas: p*≤ 0,02 e p**≤ 0,008.

As citocinas IL-17 e IL-23 também foram avaliadas tendo em vista que são envolvidas em doenças fúngicas. Nós observamos que os níveis de IL-17 foram maiores no grupo tratado com P10+DODAB no modelo de 15 dias. Já em relação aos níveis de IL-23 não observamos entre os diferentes grupos, tanto do modelo de 15 quanto de 30 dias (Figura 17).

Figura 17 - Quantificação das citocinas IL-17 e IL-23 nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.

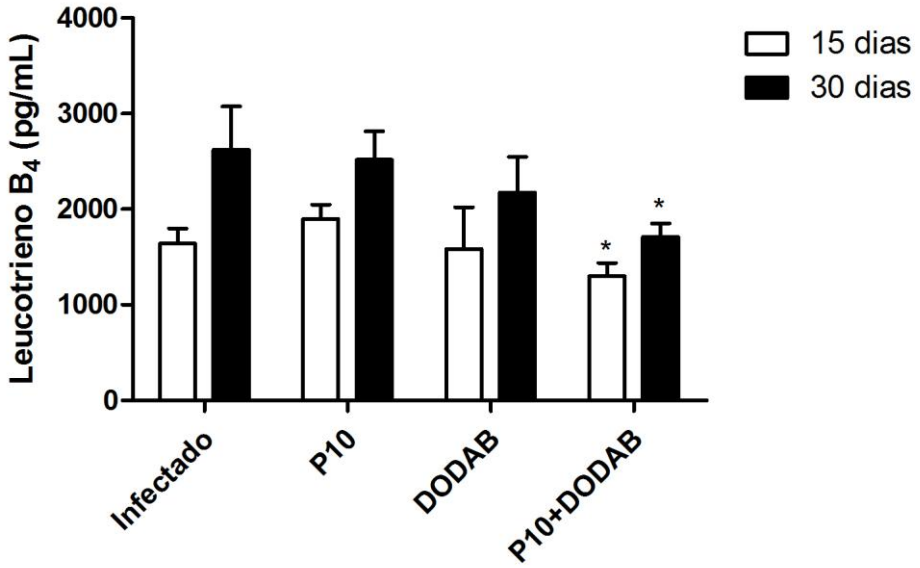


Camundongos foram infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com três doses da vacina terapêutica. Após 7 dias do último tratamento, os animais foram sacrificados e o perfil de citocinas nos pulmões foi avaliada por kit comercial de ELISA. Diferenças estatísticas comparadas ao controle infectado são indicadas: p*≤ 0,01.

5.8 Modelo terapêutico com 15 ou 30 dias de infecção: Quantificação de leucotrieno B_4

Além das quantificações de algumas citocinas para definir qual o tipo de resposta imune o tratamento vacinal desencadeia, também realizamos a quantificação de leucotrieno B4, importante elemento da resposta inflamatória. Nós observamos que o tratamento com a vacina terapêutica, iniciado após 15 ou 30 dias de infecção, resultou em redução significativa dos níveis de leucotrieno B4 nos pulmões dos animais (Figura 18).

Figura 18 - Quantificação de leucotrieno B_4 nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.



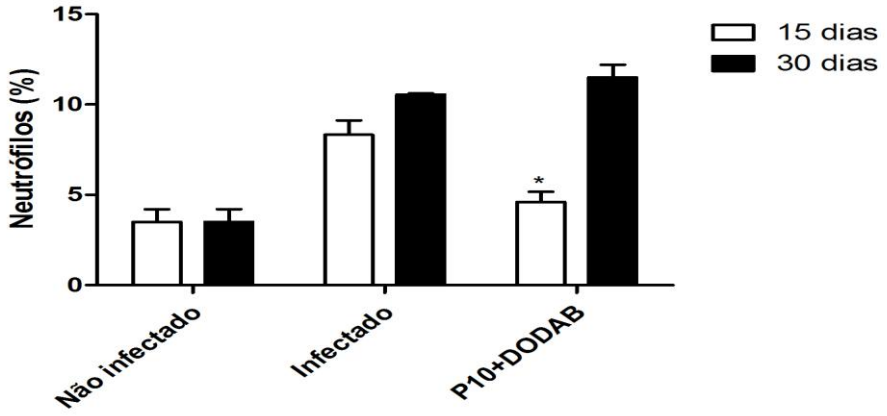
Camundongos BALB/c após 15 ou 30 de infecção com isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18), foram tratados com a vacina terapêutica. Após 7 dias do último tratamento, os animais foram sacrificados, e a quantificação de leucotrieno B_4 no macerado de pulmão foi avaliada por ensaio imunoenzimático de competição. Diferenças estatísticas comparadas ao controle infectado são indicadas: $p^* \leq 0,05$.

5.9 Modelo terapêutico com 15 ou 30 dias de infecção: Determinação de neutrófilos nos pulmões

Em trabalho anterior do nosso grupo, foi demonstrado que há influxo significativo de neutrófilos nos pulmões de camundongos imunossuprimidos que foram infectados com Pb18 e então tratados com P10 associado a antifúngico. É importante salientar que esses animais tinham pulmões mais preservados e com reduzida carga fúngica. Desse modo, é possível hipotetizar que os neutrófilos são importantes na resposta vacinal.

Em nosso modelo experimental demonstramos que o tratamento da PCM com a vacina terapêutica, seja iniciado 15 ou 30 dias após a infecção, é efetivo em reduzir a carga fúngica pulmonar. Entretanto, observamos que a presença dos neutrófilos nos pulmões desses animais ocorre de forma inversa. Assim, constatamos que o tratamento com a vacina pode induzir a redução (modelo de 15 dias) ou não (modelo de 30 dias) de neutrófilos para os pulmões dependendo do tempo de infecção (Figura 19), contrário ao esperado.

Figura 19 - Detecção de neutrófilos nos pulmões de camundongos infectados por 15 ou 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica



Camundongos BALB/c após 15 ou 30 de infecção com isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18), foram tratados com três doses da vacina terapêutica. Após 7 dias do último tratamento, os animais foram sacrificados e a presença de neutrófilos nos pulmões foi avaliada por citometria de fluxo. Camundongos saudáveis ou somente infectados foram usados como controle. Diferenças estatísticas comparadas ao controle infectado são indicadas: p*≤ 0,05 e p***≤ 0,001.

5.10 Modelo terapêutico com 15 ou 30 dias de infecção: Presença de NETs no pulmão

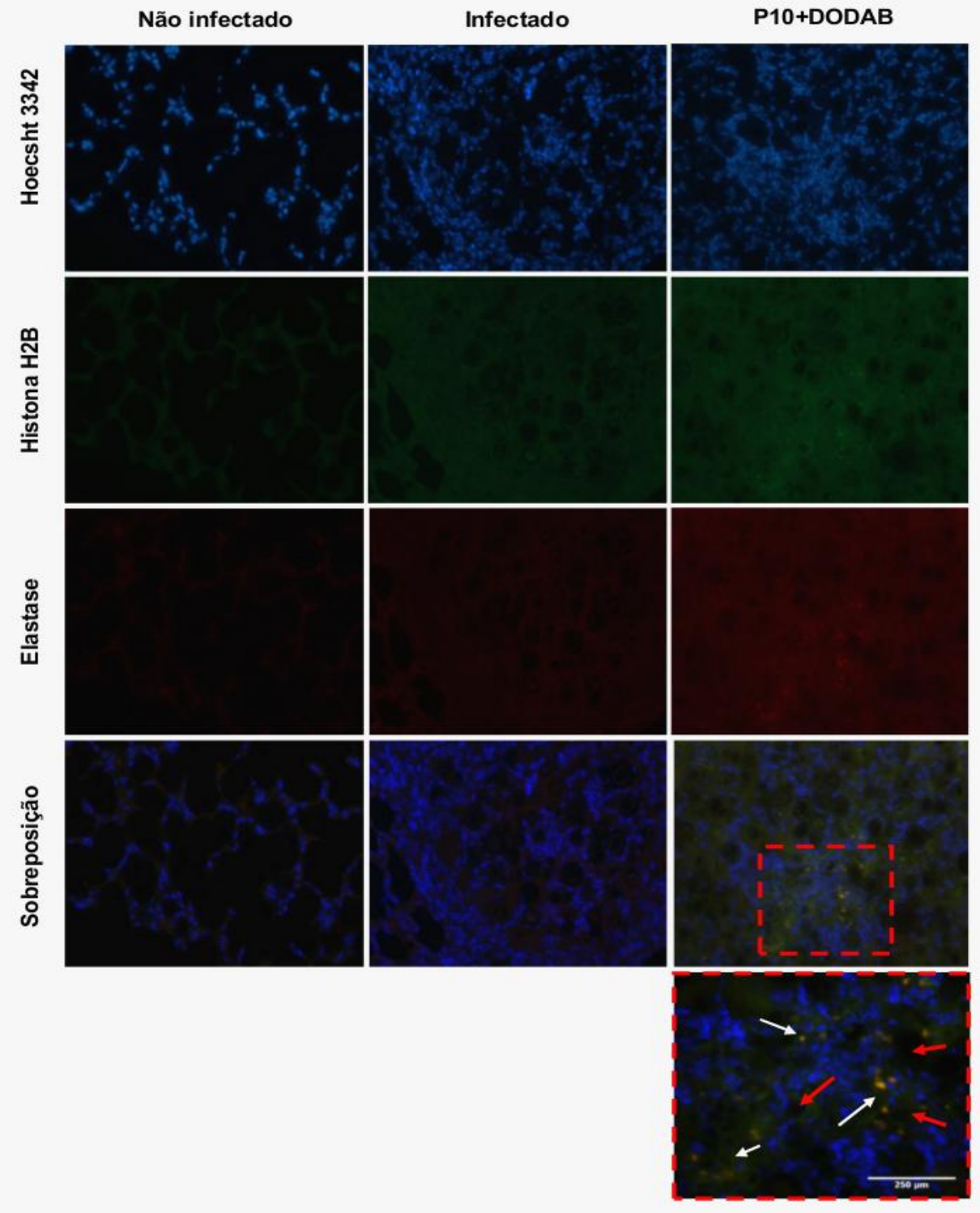
Os neutrófilos são células com elevada habilidade fagocítica e com arsenal potente de substâncias microbicidas contidas em seus grânulos. Além do mecanismo básico de fagocitose tem sido observado que os neutrófilos podem liberar uma espécie de malha de DNA e histona que contém em seu interior algumas substâncias e/ou enzimas com atividade microbicida. Essas malhas são denominadas NETs (***N****eutrophils* ***E****xtracellular* ***T****raps*) e são originadas a partir do processo de morte chamada netosis.

Em nosso estudo, avaliamos os pulmões dos animais infectados e/ou tratados com a vacina em sua capacidade de formação de NETs. A determinação de NETs nos pulmões foi avaliada por ensaio de imunofluorescência em tecido pulmonar parafinado. Nós utilizamos *Hoecsht* 3342 para visualização do DNA nuclear, anticorpo anti-Histona H2B e anticorpo anti-elastase de neutrófilos.

O ensaio de imunofluorescência revelou estruturas que são indicativas de NETs nos pulmões dos animas que foram infectados por 15 dias e então tratados com a vacina. Essas estruturas foram reveladas pela sobreposição de marcação para histona e para elastase. Nós observamos as estruturas parecem ser

granulares, pouco abundantes e próximas a leveduras de *P. brasiliensis* (Figura 20). No modelo de 30 dias não observamos indicativos de NETs em nenhuma das condições experimentais testadas (Figura 21).

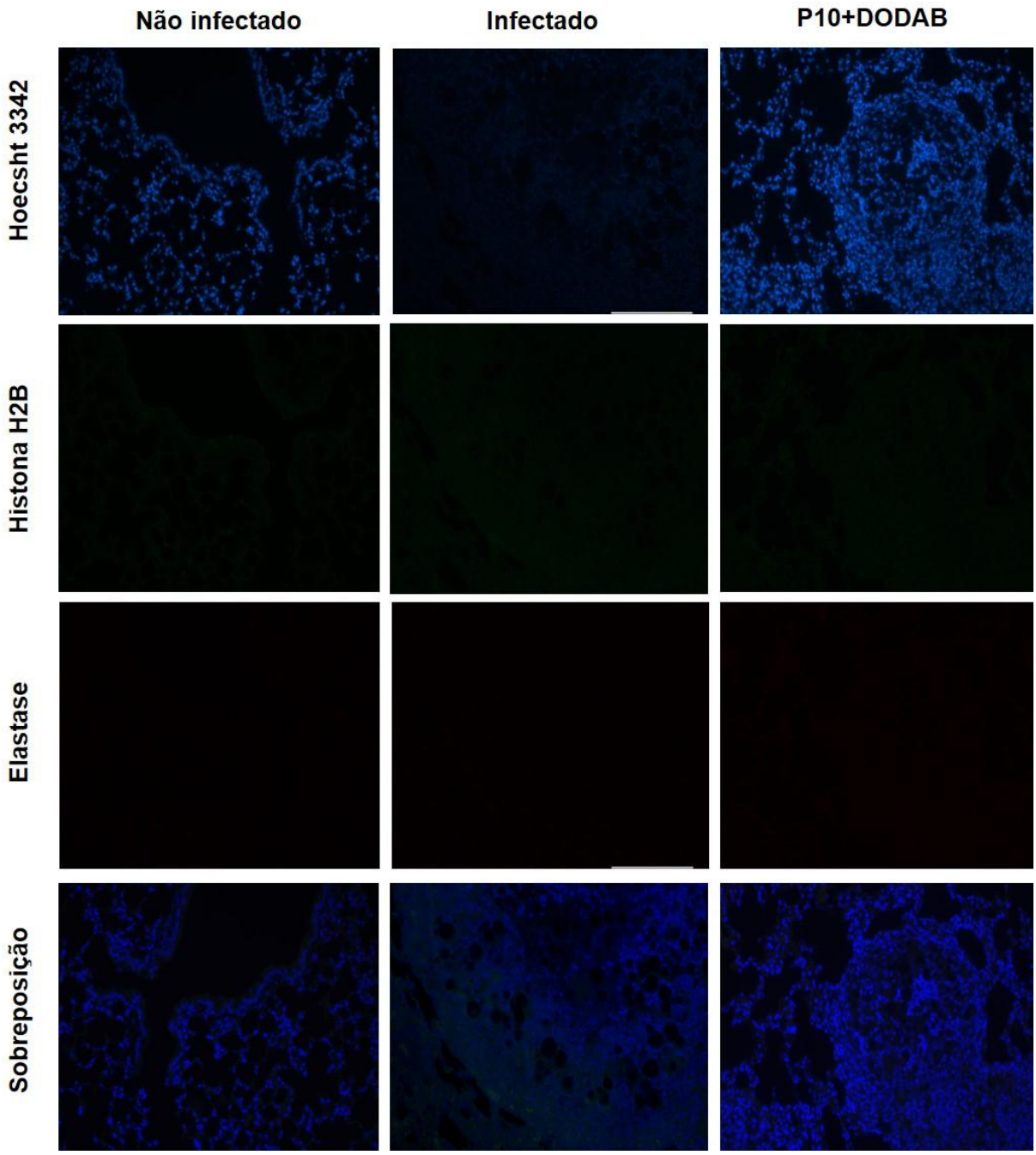
Figura 20 - Presença de NETs nos pulmões de camundongos infectados por 15 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.



Camundongos BALB/c foram infectados com leveduras do isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18) e após 15 dias foram tratados com três doses da vacina terapêutica. Após 7 dias do último tratamento, os animais foram sacrificados, os pulmões excisados e a presença de NETs foi avaliada por imunofluorescência utilizando os seguintes marcadores: *Hoescht* 3342 (DNA nuclear), anticorpo anti-histona H2B conjugado com AlexaFluor 488 e anticorpo anti-elastase neutrofílica conjugada com AlexaFluor 647. As setas brancas

indicam áreas sugestivas de NETs, que são reveladas pela sobreposição de marcação para elastase e para histona. As setas pretas indicam leveduras. Aumento de 100 x.

Figura 21 - Presença de NETs nos pulmões de camundongos infectados por 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina terapêutica.



Camundongos BALB/c foram infectados com leveduras do isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18) e após 30 dias foram tratados com três doses da vacina terapêutica. Após 7 dias do último tratamento, os animais foram sacrificados, os pulmões excisados e a presença de NETs foi avaliada por imunofluorescência utilizando os seguintes marcadores: *Hoescht* 3342 (DNA nuclear), anticorpo anti-histona H2B conjugado com AlexaFluor 488 e anticorpo anti-elastase neutrofílica conjugada com AlexaFluor 647. As setas brancas

indicam áreas sugestivas de NETs, que são reveladas pela sobreposição de marcação para elastase e para histona. As setas pretas indicam leveduras. Aumento de 100 x.

5.11 Efetividade vacinal na ausência de neutrófilos

Os resultados obtidos *in vivo* nos levaram a questionar se os neutrófilos seriam importantes nos primeiros tempos em que o tratamento é administrado. Esse questionamento é ressaltado sobretudo por conta do tratamento ser subcutâneo, o que gera dano tecidual e consequentemente deve ocorrer um influxo de neutrófilos no local da lesão.

No intuito de testar essa possibilidade, depletamos os neutrófilos da circulação periférica 24 horas antes de cada tratamento com a vacina. Para isso, escolhemos o modelo de 15 dias e o anticorpo monoclonal anti-Gr-1. Uma única administração de 200 µg do anticorpo por via intraperitoneal foi capaz de induzir uma depleção de neutrófilos por 48 horas sem afetar as outras populações hematológicas (Tabela 1).

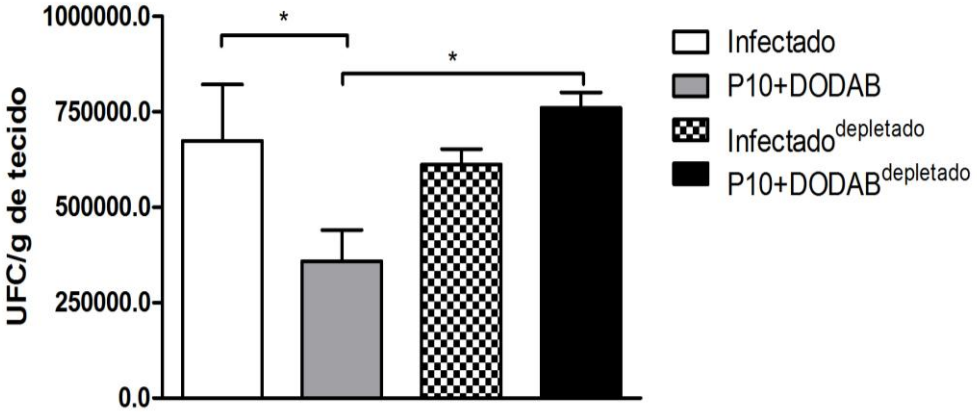
Tabela 1 – Análise hematológica de camundongos depletados com o anticorpo anti-Gr-1.

	Linfócito (%)	Mono. (%)	Eos. (%)	Bas. (%)	Neut. (%)
Não depletado	68	6	1	0,5	24,5
200 µg de Gr-1	**83**	**5**	**1**	**0,5**	**2**
250 µg de Gr-1	85	4	1	0,5	0
300 µg de Gr-1	86	2	1	0,5	0

Mono= monócitos; Eos= eosinófilo; Bas= Basófilo; Neut= neutrófilo. O melhor resultado obtido é destacado em vermelho.

Os animais que tiveram os neutrófilos depletados 24 horas antes de cada tratamento (P10+DODAB^{depletado}) mostraram carga fúngica pulmonar superior a sua contraparte não depletada (P10+DODAB). Já a carga fúngica pulmonar permaneceu igual entre os animais infectados que foram (Infectado^{depletado}) ou não depletados (Infectado), demonstrando assim que a depleção por si só não alterou a doença mas sim a efetividade da vacina (Figura 22).

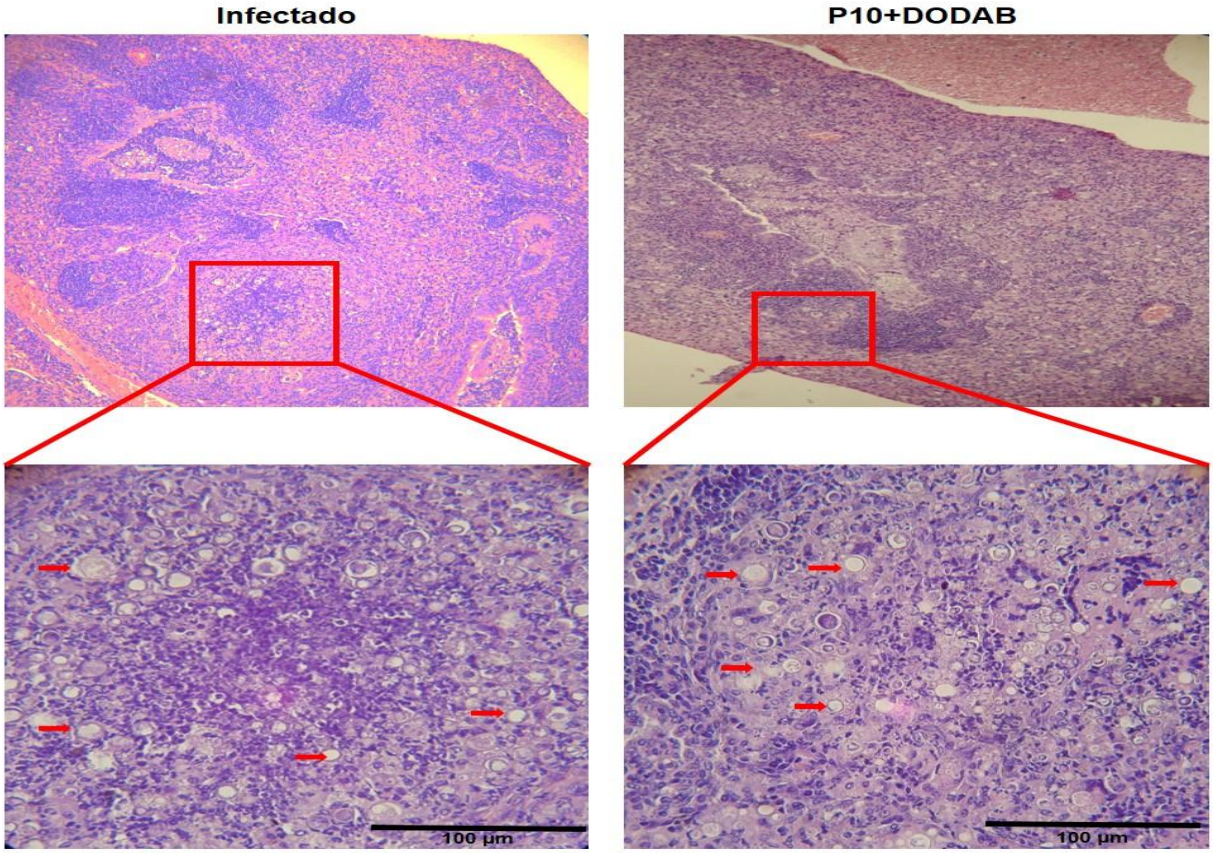
Figura 22 - Carga fúngica pulmonar em camundongos com depleção periférica de neutrófilos.



Camundongos BALB/c foram infectados por 15 dias com o isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18) e tratados com três doses da vacina terapêutica (P10+DODAB). O intervalo entre cada dose foi de 7 dias. Alguns animais receberam o anticorpo anti-Gr1, 24 horas antes de cada tratamento vacinal, com o objetivo de depletar os neutrófilos por até 48 horas. Após 7 dias da última dose da vacina, os animais foram sacrificados e a carga fúngica nos pulmões foi avaliada. Anticorpo irrelevante da mesma classe que o anti-Gr-1 (IgG2b; BD, EUA) foi usado como controle. Diferenças estatísticas comparadas ao controle infectado não depletado ou infectado e tratado não depletado são indicadas: $p^* \leq 0,05$.

A avaliação histológica dos pulmões mostrou em ambos animais – infectados apenas ou tratados com a vacina – padrão de inflamação extensa e desequilibrada com leveduras disseminadas por todo o tecido pulmonar, incluindo parênquima e alvéolos. Também não foi observada quaisquer formação de granulomas definidos (Figura 23).

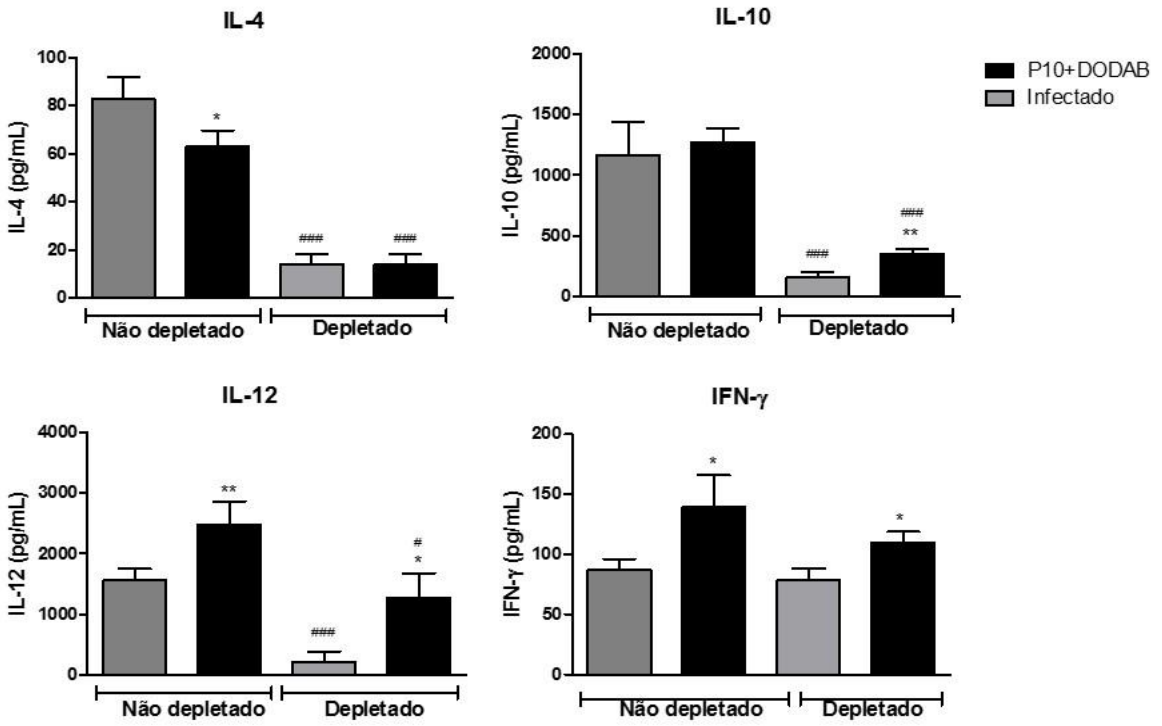
Figura 23 - Análise histológica dos pulmões de camundongos com depleção periférica de neutrófilos.



Os animais foram infectados com leveduras de *P. brasiliensis* por 15 dias e então tratados com três doses de uma vacina terapêutica (uma por semana). Além disso, os animais receberam por via intraperitoneal 200 µg de um anticorpo anti-neutrófilo (anti-Gr-1) 24 horas de cada tratamento. Anticorpo irrelevante da mesma classe que o anti-Gr-1 (IgG2b; BD, EUA) foi usado como controle. Animais apenas infectados e não tratados com a vacina foram usadas como controles. A setas vermelhas indicam leveduras. Aumento de 100 x (superior) e 200 x (inferior).

O perfil de citocinas dos pulmões desses animais também foram avaliados, com a finalidade de fornecer possíveis explicações para a perda da efetividade vacinal nos animais depletados. Primeiro, nós avaliamos algumas das citocinas envolvidas na definição de uma resposta imune Th1 (IL-12 e IFN-γ) ou Th2 (IL-4 e IL-10). Nós observamos que os níveis dessas citocinas nos animais depletados são inferiores quando comparado ao observado nos grupos não depletados. A tendência de maior produção de IL-12 e IFN-γ no grupo tratado com a vacina foi mantida no modelo de depleção. Já outras citocinas não mantiveram a mesma dinâmica quando comparada com o modelo não depletado. Desse modo, os níveis de IL-10 foram maiores no grupo tratado com P10+DODAB no modelo depletado, e não houve diferença nos níveis de IL-4 (Figura 24).

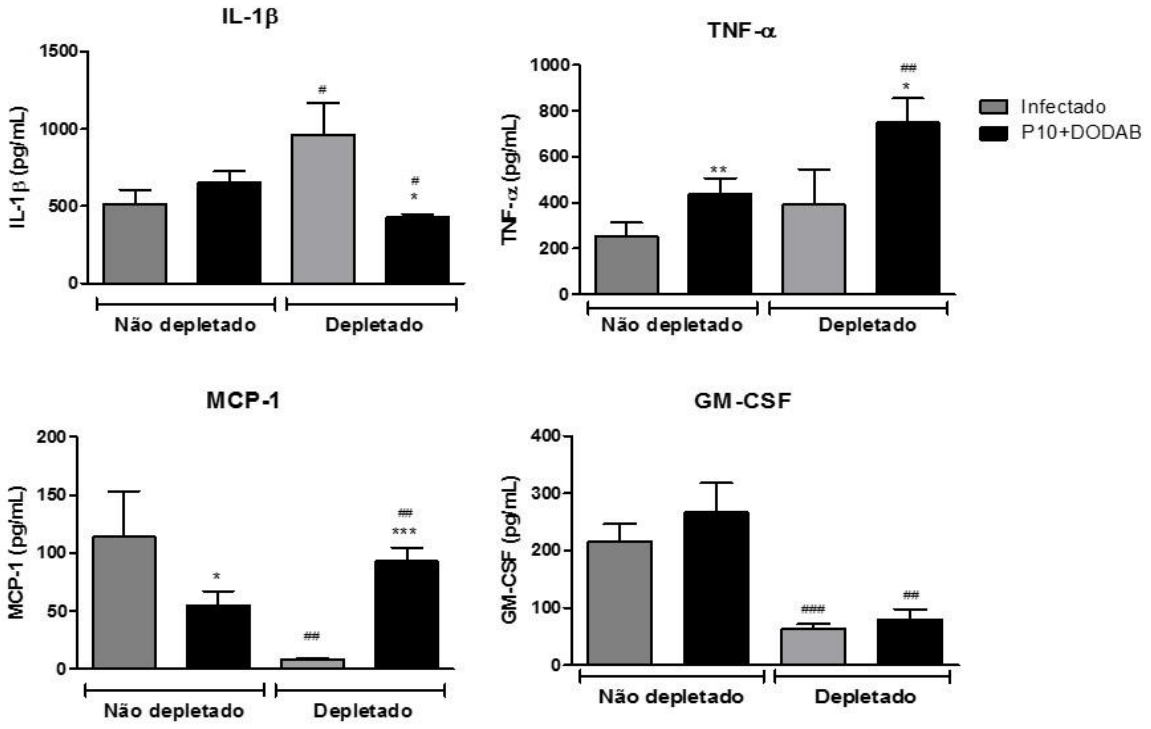
Figura 24 - Quantificação das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e IFN-γ nos pulmões de camundongos com depleção periférica de neutrófilos.



Camundongos foram infectados por 15 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e, tratados com três doses da vacina terapêutica (uma vez por semana). Os animais também receberam por via intraperitoneal 200 µg do anticorpo anti-neutrófilo (anti-Gr-1), 24 horas antes de cada tratamento. Após 7 dias do último tratamento, os animais foram sacrificados e o perfil de citocinas nos pulmões. Anticorpo irrelevante da mesma classe que o anti-Gr-1 (IgG2b; BD, EUA) foi usado como controle. As comparações estatísticas foram realizadas dentro da variável depleção (Infectado vs P10+DODAB ou Infectado depletado vs P10+DODAB depletado): $p^{*} \leq 0{,}01$, $p^{**} \leq 0{,}005$ e $p^{***} \leq 0{,}0001$; ou da variável vacina (Infectado vs Infectado depletado ou P10+DODAB vs P10+DODAB depletado): $p^{\#\#\#} \leq 0{,}0001$.

Além das citocinas que de modo geral são envolvidas no perfil de resposta imune celular ou humoral, nós também avaliamos outras citocinas envolvidas na resposta imune como MCP-1, GM-CSF, TNF-α e IL-1β. Nós observamos que os animais tratados com a vacina no grupo depletado apresentaram níveis aumentados de TNF-α e MCP-1 quando comparados tanto ao grupo não tratado quanto com sua contraparte não depletada (P10+DODAB). Já os níveis de IL-1β no grupo tratado foram menores quando comparado ao grupo infectado ou a sua contraparte não depletada (P10+DODAB) (Figura 25). Os níveis de GM-CSF foram menores no modelo depletado, quando comparado ao modelo não depletado.

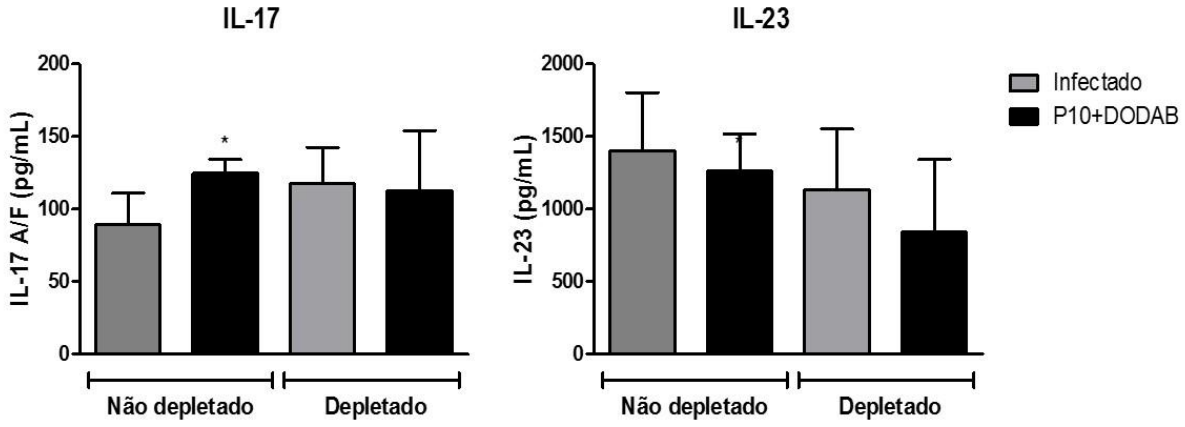
Figura 25 - Quantificação das citocinas IL-1β, TNF-α, MCP-1 e GM-CSF nos pulmões de camundongos com depleção periférica de neutrófilos.



Camundongos foram infectados por 15 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e, tratados com três doses da vacina terapêutica (uma vez por semana). Os animais também receberam por via intraperitoneal 200 µg do anticorpo anti-neutrófilo (anti-Gr-1), 24 horas antes de cada tratamento. Após 7 dias do último tratamento os animais foram sacrificados e o perfil de citocinas nos pulmões foi avaliado. Anticorpo irrelevante da mesma classe que o anti-Gr-1 (IgG2b; BD, EUA) foi usado como controle. As comparações estatísticas foram realizadas dentro da variável depleção (Infectado vs P10+DODAB ou Infectado depletado vs P10+DODAB depletado): $p^{*} \leq 0{,}01$, $p^{**} \leq 0{,}005$ e $p^{***} \leq 0{,}0001$; ou da variável vacina (Infectado vs Infectado depletado ou P10+DODAB vs P10+DODAB depletado): $p^{\#} \leq 0{,}01$, $p^{\#\#} \leq 0{,}005$ e $p^{\#\#\#} \leq 0{,}0001$.

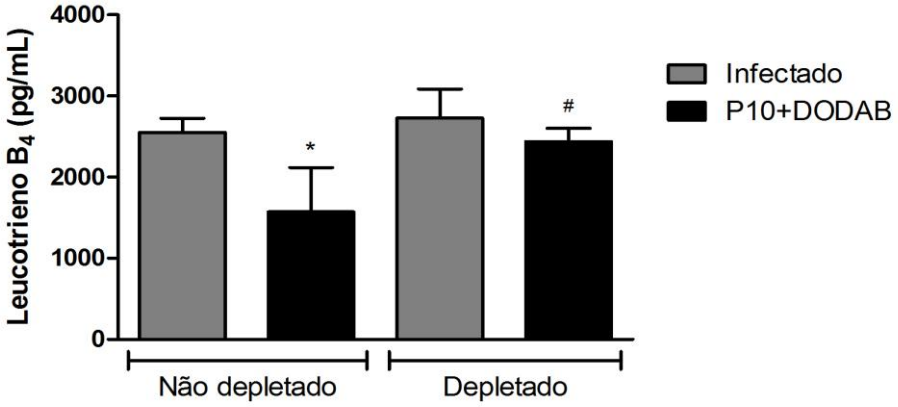
Os níveis das citocinas IL-17 e IL-23 e do leucotrieno B_4 também foram avaliadas. Não observamos diferenças nos níveis de ambas as citocinas no modelo depletado (Figura 26). Já os níveis de leucotrieno B_4 foram maiores no grupo P10+DODAB no modelo depletado, comparado a sua contraparte não depletada (P10+DODAB), mas a diferença observada entre o grupo infectado e o tratado no modelo não depletado não foi mantida (Figura 27).

Figura 26 - Quantificação das citocinas IL-17 e IL-23 nos pulmões de camundongos com depleção periférica de neutrófilos.



Camundongos foram infectados por 15 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e, tratados com três doses da vacina terapêutica (uma vez por semana). Os animais também receberam por via intraperitoneal 200 µg do anticorpo anti-neutrófilo (anti-Gr-1), 24 horas antes de cada tratamento. Após 7 dias do último tratamento os animais foram sacrificados e o perfil de citocinas nos pulmões foi avaliado. Anticorpo irrelevante da mesma classe que o anti-Gr-1 (IgG2b; BD, EUA) foi usado como controle. As comparações estatísticas foram realizadas dentro da variável depleção (Infectado vs P10+DODAB ou Infectado depletado vs P10+DODAB depletado): p*≤ 0,01; ou da variável vacina (Infectado vs Infectado depletado ou P10+DODAB vs P10+DODAB depletado).

Figura 27 - Quantificação de leucotrieno B_4 nos pulmões de camundongos com depleção periférica de neutrófilos.



Camundongos foram infectados por 15 dias com leveduras de *P. brasiliensis* e, tratados com três doses da vacina terapêutica (uma vez por semana). Os animais também receberam por via intraperitoneal 200 µg do anticorpo anti-neutrófilo (anti-Gr-1), 24 horas de cada tratamento. Após 7 dias do último tratamento os animais foram sacrificados e os níveis leucotrieno B_4 nos pulmões foram avaliados por kit comercial de ELISA. Anticorpo irrelevante da mesma classe que o anti-Gr-1 (IgG2b; BD, EUA) foi usado como controle. As comparações estatísticas foram realizadas dentro da variável depleção (Infectado vs P10+DODAB ou Infectado depletado vs P10+DODAB depletado): p*≤ 0,01; ou da variável

vacina (Infectado vs Infectado depletado ou P10+DODAB vs P10+DODAB depletado): $p^{\#} \leq 0,01$.

Os dados obtidos com os dois modelos de 15 dias (depletado e não depletado) e aqueles obtidos no modelo de 30 dias podem ser visualizados de modo esquemático pontuando as alterações em alguns parâmetros analisados quando comparado ao controle infectado equivalente (Tabela 2).

Tabela 2 – Diferenças observadas no grupo tratado com a vacina comparada ao grupo controle infectado nos diferentes modelos *in vivo.*

Parâmetros	Modelo 15 dias	Modelo 30 dias	Modelo 15 dias depletado
UFC (pulmão)	↓	↓	Não alterado
Neutrófilos	↓	Não alterado	Não determinado
NETS	Presente	Ausente	Não determinado
LTB_4	↓	↓	Não alterado
IL-4	↓	Não alterado	Não alterado
IL-10	Não alterado	↓	↑
IL-12	↑	Não alterado	↑
IFN-γ	↑	Não alterado	↑
TNF-α	↑	Não alterado	↑
GM-CSF	Não alterado	↑	Não alterado
MCP-1	↓	↓	↑
IL-1β	Não alterado	Não alterado	↓
IL-17	↑	Não alterado	Não alterado
IL-23	Não alterado	Não alterado	Não alterado

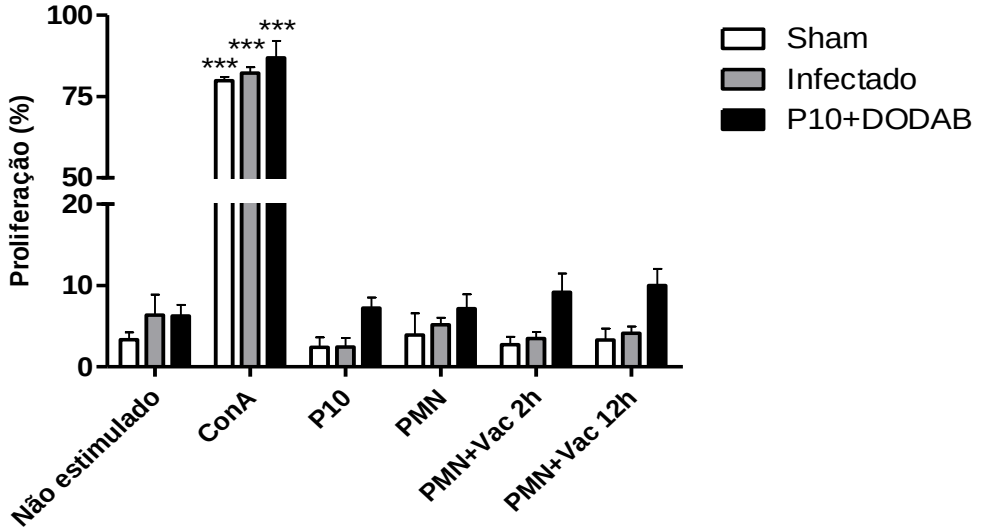
As setas em vermelho representam parâmetros observados no grupo depletado que são opostas ao grupo não depletado (modelo de 15 dias).

5.12 Linfoproliferação induzida por neutrófilos estimulados com a vacina

A hipótese de que os neutrófilos sejam importantes no processo de imunização/tratamento foi avaliada mais a fundo através do experimento de linfoproliferação. O racional por trás desse experimento era saber se os neutrófilos poderiam atuar como células apresentadoras de antígeno na resposta vacinal. Para isso, estimulamos neutrófilos murinos com a vacina (P10+DODAB) por 2 ou 12 horas e, em seguida essas células foram colocadas em contato com esplenócitos de camundongos saudáveis, infectados ou infectados e tratados. Após incubação por até 96 horas, avaliamos a proliferação de linfócitos T CD4+ por citometria de fluxo.

Nós observamos que a taxa de proliferação dos esplenócitos de camundongos infectados e tratados com a vacina foi superior àquelas observadas nos esplenócitos de animais saudáveis ou apenas infectado. Entretanto, não houve diferença entre as diferentes condições avaliadas (Figura 28). Assim, não podemos afirmar que neutrófilos estimulados com a vacina foram capazes de apresentar o peptídeo P10 e de induzir proliferação.

Figura 28 - Ensaio de linfoproliferação *ex vivo*.



Neutrófilos murinos (PMN) foram purificados da medula óssea de camundongos BALB/c e, estimulados com a vacina (Vac) por 2 ou 12 horas. Posteriormente, essas células foram incubadas com esplenócitos de camundongos saudáveis, infectados ou infectados e tratados com a vacina. Após 72 horas a proliferação de linfócitos T CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo. Como controle positivo as células foram estimuladas com concanavalina a (ConA). Diferenças estatísticas comparadas ao controle não estimulado ou estimulado com neutrófilo p***≤ 0,001.

6 DISCUSSÃO

A formulação vacinal escolhida para realização desses ensaios foi baseada no estudo anterior do grupo que mostrou que o lipídio catiônico DODAB é um excelente adjuvante a ser associado com o P10 (Mayorga *et al.,* 2012). Avaliamos as características físicas mais básicas dessa formulação vacinal, como tamanho, potencial zeta e polidispersão. Observamos que a associação de P10 com DODAB se apresenta em escala micrométrica (4990 nm ou 4,9 µm), com caráter catiônico e pouco dispersa (homogêneo).

O tamanho da formulação vacinal é de grande relevância, haja vista que isso pode direcionar o complexo para determinado tipo celular, podendo resultar em aumento ou redução da efetividade vacinal. Desse modo, é possível especular que pelo tamanho obtido, o complexo P10 e DODAB, quando administrado por via subcutânea, seja captado principalmente por macrófagos uma vez que partículas entre 500 e 5000 nm são fagocitadas principalmente por essas células (Bachmann, Jennings, 2010).

O caráter catiônico da formulação vacinal também é importante nessa dinâmica (Lincopan *et al.,* 2009). De modo geral, as células de mamíferos apresentam potencial de membrana negativo, e assim, por princípio eletrostático, a interação entre P10 mais DODAB e a célula é facilitada. O que seria mais complicado de ocorrer caso a vacina apresentasse um caráter negativo (repulsão eletrostática). É necessário observar que tanto o peptídeo quando o lipídeo apresenta carga positiva.

Posteriormente às análises de tamanho e carga, iniciamos a investigação do envolvimento dos neutrófilos na resposta imune desencadeada pela formulação vacinal. Essa investigação se dividiu em duas frentes: *in vitro* e *in vivo.* No que se refere a frente *in vitro*, analisamos os efeitos da vacina sobre neutrófilos murinos. Já em *in vivo*, a dinâmica entre um modelo de vacina terapêutica e os neutrófilos.

No que se refere aos dados *in vitro*, primeiro procuramos compreender a participação dos receptores TLR-2, TLR-4 e dectina-1 na morte de *P. brasiliensis* por neutrófilos murinos. Esses receptores reconhecem importantes padrões moleculares associados a patógenos, e assim são importantes na indução de uma resposta

imune (Romani, 2011). Na PCM todos os três receptores tem sido extensivamente estudados e podem estar associados com resistência ou suscetibilidade (Loures *et al.,* 2009; Loures *et al.,* 2010; Feriotti *et al.,* 2015), por isso o interesse dos mesmos em nosso estudo.

Nós observamos que neutrófilos previamente estimulados com IFN-γ necessitam de TLR-2, TLR-4 e dectina-1 para matar um isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18). Esse dado está em conformidade com outro estudo que mostrou que neutrófilos humanos parecem utilizar TLR-2 e TLR-4 no reconhecimento de leveduras de *P. brasiliensis* (Bonfim *et al.,* 2009). Além disso, já foi demonstrado que neutrófilos de camundongos nocautes para TLR-2 quando desafiados com *C. albicans* apresentaram capacidade fagocítica, produção de óxido nítrico e atividade de mieloperoxidase reduzidas (Tessarolli *et al.,* 2010). Contudo, na ausência de estímulo, observamos que dectina-1 passa a ser importante na morte de *P. brasiliensis*. Entretanto, para compreender melhor este fenômeno, experimentos adicionais serão necessários.

Posteriormente a esses achados iniciais, nos propusemos a avaliar o efeito da vacina sobre a expressão de TLR-2, TLR-4 e dectina-1 em neutrófilos de 3 linhagens de camundongos que representam resistência intermediária (C57Bl/6 e BALB/c) e suscetibilidade (B10.A) à PCM (Calich *et al.,* 1985). Observamos *in vitro* que a formulação vacinal foi capaz de induzir o aumento de subpopulações de neutrófilos expressando TLR-2, TLR-4 e dectina-1 tanto em B10.A quanto BALB/c, mas com menor eficiência em C57Bl/6.

No entanto, os dados de expressão por si só não são traduzíveis do ponto de vista funcional. Nesse sentido, refinamos a análise para entender em que implica os neutrófilos terem mais TLR-2, TLR-4 ou dectina-1 em sua superfície. Selecionamos a linhagem BALB/c, pois o modelo *in vivo* é padronizado nessa linhagem. Perguntamos se os neutrófilos que foram estimulados com vacina fagocitariam mais leveduras e seriam também efetivos na morte das mesmas.

Nossos resultados indicaram que o aumento de TLR-2, TLR-4 e dectina-1 na superfície de neutrófilos estimulados com vacina não implicou em maior capacidade fagocítica e nem em maior habilidade de morte. Nossos dados estão parcialmente

de acordo com um estudo que sugeriu que leveduras de *P. brasiliensis* sejam reconhecidas via TLR-2 e TLR-4 e que isso resulta em aumento da capacidade fagocítica e da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos. No entanto, essa ativação não leva a uma maior redução de crescimento fúngico. Assim, concluiu-se que a interação de TLRs seja um mecanismo de patogenicidade de *P. brasiliensis*, pelo qual a célula fúngica possa infectar células do hospedeiro e multiplicar-se (Calich *et al.,* 2008).

Acorci-Valerio *et al.,* (2010) descreveram que *P. brasiliensis* utiliza TLR-4 para ter acesso ao neutrófilos humanos e que isso não resulta em maior atividade de morte do fungo (Acorci-Valério *et al.,* 2010). Outro estudo sugere a participação de TLR-2, TLR-4 e dectina-1 no reconhecimento de *P. brasiliensis*, internalização e consequente ativação da resposta imune contra fungo (Bonfim *et al.,* 2009). Nesse estudo foi observado que há um reconhecimento diferencial do isolado utilizado de *P. brasiliensis* e que isso resulta em uma distinta produção de citocinas.

Os dados obtidos *in vitro* demonstram que a formulação de P10+DODAB conseguiu induzir a expressão de TLR-2, TLR-4 e dectina-1 em neutrófilos, mas que esse efeito não tornou a célula mais avidas a fagocitar e matar leveduras de *P. brasiliensis*. No entanto, é possível conjecturar que o aumento desses receptores possa influir sobre a produção diferencial de citocinas (Bonfim *et al.,* 2009; Balderramas *et al.,* 2014). Estudos complementares são necessários para avaliar com maior complexidade essa dinâmica.

O desenvolvimento de uma vacina contra a paracoccidioidomicose nos moldes clássicos da vacinologia – isto é, como intervenção profilática – apresenta algumas limitações no que se refere ao público alvo (quem vacinar?) e ao período (quando vacinar?). É especulado que a maior parte dos indivíduos entram em contato com o fungo, mas não desenvolvem a doença. Assim sendo, a vacina como profilaxia perde seu poder, mas ganha novos ares como medida terapêutica, sobretudo considerando o extenso tempo de tratamento com antifúngicos e o desenvolvimento de sequelas.

Nesse estudo optamos pelo modelo experimental de vacina terapêutica contra PCM. Inicialmente os animais foram infectados por 15 ou 30 dias com leveduras do

isolado virulento de *P. brasiliensis* (Pb18) e então tratados com três doses de uma vacina constituída do peptídeo P10 associado ao lipídio catiônico DODAB. A escolha da vacina foi feita com base em estudo prévio do grupo (Mayorga *et al.,* 2012). No entanto, o principal foco era investigar a participação dos neutrófilos nessa dinâmica vacinal.

Observamos que, independentemente do tempo de infecção, a vacina terapêutica foi efetiva na redução da carga fúngica pulmonar. Além disso, os animais tratados com a vacina mostraram arquitetura pulmonar mais preservada, livre de inflamação e com poucos granulomas, estes compactos, organizados e com poucas leveduras em seu interior. Esses dados estão em conformidade com os dados da literatura relacionados a resolução da PCM induzida por vacina (Mayorga *et al.,* 2012; Alves da Costa *et al.,* 2015).

A vacina terapêutica também foi capaz de reduzir a formação de fibrose pulmonar, tanto em animais infectados por 15 quanto por 30 dias com leveduras de *P. brasiliensis*. A formação de fibrose pulmonar é o principal agravante da doença, uma vez que o parênquima ao ser substituído por tecido cicatricial perde sua funcionalidade e consequentemente há perda de capacidade respiratória do paciente (Da Silva *et al.,* 2009).

Em modelos animais de PCM, a formação de fibrose tem início a partir da 4ª semana de infecção, sendo acompanhado de níveis elevados de TNF-α e TGF-β que parecem induzir maior deposição de colágeno no tecido (Franco *et al.,* 1998; González *et al.,* 2008). Muito provavelmente, isso explica porque nós observamos níveis de TNF-α maiores no modelo de 30 dias (7 semanas de infecção) do que no de 15 dias de infecção (5 semanas de infecção). Entretanto, a vacina não conseguiu reduzir os níveis dessa citocina em ambos os modelos. A produção de TGF-β não foi analisada.

Os neutrófilos parecem estar envolvidos na formação da fibrose pulmonar na paracoccidioidomicose. Em modelo animal de PCM foi demonstrado que o tratamento com pentoxifilina e itraconazol após 4 ou 8 dias de infecção, foi capaz de reduzir tanto o infiltrado neutrofílico quanto a fibrose pulmonar (Naranjo *et al.,* 2011). E mais recentemente, a depleção de neutrófilos em fases mais tardias da infecção

foi relacionado à resolução da doença e menor formação de fibrose (Puerta-Arias *et al.,* 2016). Desse modo, parece que os neutrófilos seriam desfavoráveis na fase tardia da infecção, podendo funcionar como alvos terapêuticos.

Nesse sentido, nossos resultados demonstram que a vacina terapêutica foi capaz de reduzir o número de neutrófilos nos pulmões de camundongos infectados com *P. brasiliensis* por 15 dias. No entanto, quando a vacina foi administrada 30 dias após a infecção, não foi observada aumento ou diminuição destas células. Nós não sabemos se a efetividade vacinal no modelo de 15 dias de infecção decorre da redução dos neutrófilos no tecido pulmonar.

'É imperativo perceber que os neutrófilos parecem ser células importantes no combate a patógenos fúngicos em pacientes com algum tipo de imunossupressão ou com neutropenia (Low, Rotstein, 2011). Essa informação mostra o quão criterioso deve ser a análise referente a importâncias dos neutrófilos na resposta imune, o que parece envolver diversas variáveis.

Em acordo com esse olhar mais cauteloso, observamos, de forma inesperada, indícios de formação de NETs no tecido pulmonar daqueles animais que tiveram o número de neutrófilos reduzidos pela vacina. Isto é, no modelo de 15 dias de infecção. Nós acreditamos que esse achado pode ser explicado pela conjunção de dois fatores: (1) o tamanho maior da levedura quando comparado ao neutrófilo e (2) pela maior proporção de leveduras em relação aos neutrófilos.

A nossa hipótese é sustentada por dados da literatura que parecem indicar que os neutrófilos são capazes induzir a formação de NETs quando o micro-organismo ou é muito grande ou está em maior proporção (Branzk *et al.,* 2014). A formação de NETs induzida por *P. brasiliensis* já foi demonstrada em humanos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Della Coletta et al., 2015; Mejía et al., 2015), e parece ser um mecanismo que envolve o receptor dectina-1 (Bachiega *et al.,* 2015).

A formação de NETs abrange a morte dos neutrófilos por um processo denominado netosis, e com consequente liberação de malha extracelular constituída de DNA e histona e que alberga em seu interior enzimas como a elastase neutrofílica (Fuchs *et al.,* 2007).Essa malha pode envolver o micro-organismo e levar

à morte do mesmo, como já descrito para fungos e bactéria (Urban *et al.,* 2006; McDonald *et al.,* 2012).

Além disso, as NETs parecem estar envolvidas na degradação de citocinas e quimiocinas, podendo até mesmo controlar a inflamação (Schauer *et al.,* 2014). É sabido que a formação de NETs está prejudicada em pacientes com doença granulomatosa crônica, o que parece predispor esses indivíduos a algumas enfermidades (Fuchs *et al.,* 2007).

Os dados disponíveis na literatura sobre NETs mostram a atuação dinâmica desse mecanismo frente ao micro-organismo, seja por via direta (morte do micro-organismo envolvido) ou por via indireta (degradação de citocinas; restrição da inflamação). Essa conclusão por sua vez permite-nos indagarmos se as NETs observadas no modelo de 15 dias de infecção são um dos mecanismos que garantem a efetividade da vacina terapêutica. Indagação que precisa ser melhor investigada.

No esforço de melhor entender a participação dos neutrófilos na resposta imune desencadeada pela vacina terapêutica, testamos uma das duas hipóteses do trabalho. Esse hipótese diz que os neutrófilos são importante no momento em que a vacina é administrada. A outra hipótese não testada diz que os neutrófilos são importante na resposta imune final. Isto é, a vacina induz a redução ou aumento de neutrófilos no tecido pulmonar, que por sua vez está relacionado com efetividade vacinal.

A primeira hipótese foi testada depletando os neutrófilos nas primeiras 24 horas em que cada tratamento foi administrado. A depleção foi realizada obtida por meio da aplicação intraperitoneal do anticorpo contra Gr1 (clone RB6/8C5) 24 horas antes de cada tratamento, sendo o efeito mantido por mais 24 horas. Para nossa surpresa, os animais tratados com a vacina não tiveram a carga fúngica pulmonar reduzida, demonstrando que o tratamento não foi efetivo.

A princípio, pode-se cogitar que a vacina perdeu a efetividade porque o modo de depleção dos neutrófilos é pontual e não constante. Assim, a depleção em períodos esporádicos perturbaria o sistema. Logo, a vacina teria perdido a efetividade não porque essas células são importante no momento em que a vacina é

administrada e sim porque há perturbação no padrão da doença. No entanto, essa explicação pode ser desconsiderada uma vez que o animal infectado depletado apresenta a mesma carga fúngica de um animal infectado não depletado.

É possível que a perda do efeito vacinal não seja decorrente da depleção do neutrófilos e sim de outras células. Embora tenhamos feito um ensaio prévio de dosagem do anticorpo contra Gr1 com relação à depleção de outras células hematológicas, essa hipótese não pode ser descartada. Já foi demonstrado na literatura que o anticorpo contra Gr1 é capaz de depletar outras populações celulares, como células dendríticas plasmacitóides, monócitos e linfócitos T CD8+ (Daley *et al.,* 2007).

O anticorpo contra Gr1, produzido pelo clone RB6/8C5, reconhece tanto o antígeno Ly6G (principalmente expresso em neutrófilo) quanto o Ly6C (expresso em células como monócitos e células dendríticas). Nesse sentido, tem sido utilizado o anticorpo anti-Ly6G, produzido pelo clone 1A8, na depleção específica dos neutrófilos (Daley *et al.,* 2007).

Em conformidade com esses dados, foi observado que a depleção de células imune Gr-1^{+} e não Ly6G^{+} exacerbou a replicação viral e a doença em um modelo animal de infecção pelo vírus herpes simplex tipo I (Wojtasiak *et al.,* 2010). Os dados gerados utilizando o anticorpo contra Gr1 devem ser analisados com cautela.

Em modelos experimentais de paracoccidioidomicose as conclusões obtidas com o anticorpo contra Gr1 ou contra Ly6G são muito similares (Pina *et al.,* 2006; Pino-Tamayo *et al.,* 2016), de modo que acreditamos que o dado observado em nosso estudo esteja relacionado aos neutrófilos e não a outras células.

A ausência de neutrófilos nas primeiras 24 horas após cada dose da vacina terapêutica alterou totalmente o padrão de resposta imune. A histologia dos pulmões do animais tratados com a vacina mostrou disseminação do fungo por todo o tecido, sendo observado aumento de citocinas envolvidas na inflamação ou na resposta imune humoral (IL-4, IL-10, IL-1β, TNF-α e MCP-1).

Esses dados parecem estar em acordo com alguns estudos disponíveis na literatura que mostram que os neutrófilos podem estar envolvidos na apresentação

antigênica ou no transporte de antígenos para órgão linfoides em respostas vacinas (Calabro *et al.,* 2011; Yang *et al.,* 2010). Além disso, já foi demonstrado que os neutrófilos podem modular a atividade de macrófagos, seja potencializando a atividade microbicida dessas células ou intervindo no processo de diferenciação de M1 para M2 (Chen *et al.,* 2014).

Em um estudo com pacientes de PCM oral foi sugerido que os neutrófilos participaram na formação dos granulomas e que a sobrevivência dessas células parece envolver o fator de transcrição Nrf2 (Araújo *et al.,* 2013). Nessa direção, tem sido demonstrado que *P. brasiliensis* promove uma maior tempo de sobrevivência dos neutrófilos por induzir nessas células a produção autócrina de IL-8. E esse feito por sua vez parece ser um mecanismo que o hospedeiro desenvolve para combater a infecção fúngica persistente (Acorci *et al.,* 2009).

Embora os nossos dados demostrem que o neutrófilos são importante no momento em que o tratamento é administrado, não podemos afirmar que esse efeito esteja relacionado à participação dessas células na apresentação antigênica. Nós avaliamos essa possibilidade através de um ensaio de linfoproliferação em co-cultivo, contendo neutrófilos estimulados com a vacina e linfócitos provenientes de animais imunizados com a vacina. Os neutrófilos não foram capazes de induzir a proliferação de linfócitos primados.

Em relação ao perfil de resposta imune, é sabido que a resposta imune celular é mais efetiva do que a humoral no combate a infecções fúngica (Romani, Puccetti, 2007). Entretanto, não se deve descartar a participação da imunidade humoral nessa dinâmica. Nesse sentido, nós observamos que a vacina, quando administrada em animais com infecção recente (15 dias), parece induzir um perfil do tipo celular. Isso pode ser inferido a partir da constatação do aumento de citocinas como IL-12 e IFN-γ e da redução de IL-4 nos pulmões dos animais que foram tratados com vacina.

Em contrapartida, não conseguimos observar um padrão de resposta imune definido no modelo de 30 dias de infecção, o que contrasta com o que foi observado anteriormente (Mayorga *et al.,* 2012). O peptídeo P10 possui como principal característica induzir o aumento de IFN-γ por linfócitos T $CD4^+$ (Taborda *et al.,*

2015). Apesar disso, não conseguimos explicar porque não observamos esse mesmo fenômeno no modelo de 30 dias de infecção.

A vacina terapêutica foi capaz reduzir os níveis de leucotrieno B_4 (LTB_4) nos pulmões de animais com 15 ou 30 dias de infecção. Alguns pesquisadores tem sugerido que LTB_4 possibilita que os macrófagos consigam fagocitar e matar leveduras de *P. brasiliensis* com mais eficiência (Santos *et al.,* 2013). Esse mecanismo parece envolver o aumento na produção de óxido nítrico (NO).

Embora a produção de NO seja um dos mecanismos mais efetivos em macrófagos para matar *P. brasiliensis*, é conhecido que altos níveis de NO parecem estar associados com a supressão da imunidade mediada por células T (Bocca *et al.,* 1998). No modelo experimental de PCM foi demonstrado que camundongos C57Bl/6 nocautes para NO apresentam infecção mais controlada e maior tempo de sobrevida (Bernardino *et al.,* 2013).

Acreditamos que redução de LTB_4 induzida pela vacina terapêutica em animais com 15 ou 30 dias de infecção possa ser um dos mecanismo que levam a produção controlada de NO. No entanto, como não foi possível avaliar a produção de NO no tecido pulmonar, é preciso realizar experimentos complementares para confirmar essa hipótese.

Em síntese, os dados obtidos no presente estudo permite afirmar que a vacina terapêutica contra PCM - constituída pelo peptídeo P10 e pelo lipídio catiônico DODAB – é efetiva mesmo em tempos distintos de infecção, e parece envolver a participação dos neutrófilos. Além disso, demonstramos que uma vacina terapêutica é capaz de induzir a formação de NETs em tecido pulmonar.

7 CONCLUSÃO

- A vacina terapêutica contra PCM, constituída pelo peptídeo P10 associado ao lipídeo catiônico DODAB, induz *in vitro* a expressão de importantes receptores (TLR-2, TLR-4 e dectina-1) na superfície de neutrófilos murino. No entanto, esse efeito não implica em maior capacidade de fagocitose e de morte intracelular;
- A vacina terapêutica é capaz de reduzir a carga fúngica pulmonar independente do tempo de infecção/doença;
- A vacina terapêutica quando administrada em animais com história recente de infecção (15 dias) é capaz de reduzir a população de neutrófilos do tecido pulmonar;
- A vacina terapêutica é capaz de induzir a formação de NETs no tecido pulmonar.
- Em modelo recente de infecção (15 dias) os neutrófilos parecem ser extremamente importante na modulação da resposte imune desencadeada pela vacina. Especificamente no momento em que o tratamento é administrado.

REFERÊNCIAS**

Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. International Immunology, 2011;*23*(5): 317–26.

Acorci-Valério MJ, Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, de Assis Golim M, Nakaira-Takahagi E, de Campos Soares ÂMV. Role of TLR2 and TLR4 in Human Neutrophil Functions Against *Paracoccidioides brasiliensis*. Scandinavian Journal of Immunology, 2010;*71*(2): 99–108.

Acorci MJ, Dias-Melicio LA, Golim MA, Bordon-Graciani AP, Peraçoli MTS, Soares ÂMVC. Inhibition of Human Neutrophil Apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis* : Role of Interleukin-8. Scandinavian Journal of Immunology, 2009; *69*(2): 73–9.

Almeida OP, Jorge Junior J, Scully C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Critical reviews in oral biology and medicine*, 2003; *14*(4): 268–74.

Alves da Costa T, Di Gangi R, Martins P, et al. Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice treated with modulated dendritic cells relies on inhibition of interleukin-10 production by $CD8^+$ T cells. Immunology, 2015; 146(3): 486–95.

Amaral EP, Ribeiro SCM, Lanes VR, et al. Pulmonary Infection with Hypervirulent Mycobacteria Reveals a Crucial Role for the P2X7 Receptor in Aggressive Forms of Tuberculosis. PLoS Pathogens, 2014; *10*(7): e1004188.

Araújo VC, Demasi APD, Soares AB, et al. Neutrophils in Oral Paracoccidioidomycosis and the Involvement of Nrf2. PLoS ONE, 2013; *8*(10): e76976.

Bachiega TF, Dias-Melicio LA, Fernandes RK, et al. Participation of dectin-1 receptor on NETs release against *Paracoccidioides brasiliensis*: Role on extracellular killing. Immunobiology, 2015; *221*: 228–35.

Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery : a matter of size , geometry , kinetics and molecular patterns. Nature Publishing Group, 2010;10(11): 787–96.

Bagagli E, Bosco SMG, Theodoro RC, Franco M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. Infection, Genetics and Evolution, 2006; 6(5): 344–51.

Bagagli E, Franco M, Bosco SDMG, Hebeler-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (Dasypus novemcinctus): an ecological study. Medical mycology, 2003*;* 41(3): 217–23.

Bagagli E, Theodoro RC, Bosco, SMG, McEwen JG. *Paracoccidioides brasiliensis*:

** De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm

Phylogenetic and ecological aspects. Mycopathologia, 2008;165(4–5): 197–07.

Baida H, Biselli PJC, Juvenale M, et al. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. Microbes and Infection, 1999; *1*(4): 273–78.

Balderramas HA, Penitenti M, Rodrigues DR, et al. Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. Cytokine, 2014; 67(1): 36–43.

Barrozo LV, Benard G, Silva MES, Bagagli E, Marques SA, Mendes RP. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2010; 4(3): 2–5.

Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Silva MES, Bagagli E, Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *International Journal of Epidemiology*, 2009; *38*(6): 1642–49.

Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. Mycopathologia, 2008;165(4–5): 209–21.

Benard G, Hong MA, Del Negro GMB, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJS. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,1996; *54*(1): 7–12.

Benard G, Mendes-Giannini MJ, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJ. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two Paracoccidioides brasiliensis glycoproteins that elicit strong humoral immune response. The Journal of infectious diseases, 1997; 175(5): 1263–67.

Bernardino S, Pina A, Felonato M, et al. TNF-α and CD8+ T Cells Mediate the Beneficial Effects of Nitric Oxide Synthase-2 Deficiency in Pulmonary Paracoccidioidomycosis. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2013; *7*(8): e2325.

Bethlem EP, Capone D, Maranhao B, Carvalho CRR, Wanke B. Paracoccidioidomycosis. Current Opinion in Pulmonary Medicine, 1999; *5*(5): 319–25.

Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. Journal of Clinical Microbiology, 2000; 38(8): 2940–42.

Bittencourt JIM, Oliveira RM de, Coutinho ZF. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. Cadernos de Saúde Pública, 2005; 21(6): 1856–64.

Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, et al. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. Journal of immunology, 1998; 161(6): 3056–63.

Bonfim CV, Mamoni RL, Lima Blotta MHS. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. Medical Mycology, 2009; 47(7): 722–33.

Braga CJM, Rittner GMG, Munoz Henao JE, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* Vaccine Formulations Based on the gp43-Derived P10 Sequence and the Salmonella enterica FliC Flagellin. Infection and Immunity, 2009;77(4): 1700–07.

Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. Nature Immunology, 2014; 15(11): 1017–25.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clinical microbiology reviews, 1993; *6*(2): 89–117.

Buitrago MJ, Merino P, Puente S, et al. Utility of real-time PCR for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA in the diagnosis of imported paracoccidioidomycosis. Medical mycology, 2009; 47(8): 879–82.

Burger E, Vaz CCA, Sano A, et al. Paracoccidioides brasiliensis infection in nude mice: Studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1996; 55(4): 391–98.

Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. Vaccine, 2011; *29*(9): 1812–23.

Calich VLG, da Costa TA, Felonato M, et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Mycopathologia, 2008;165(4–5): 223–36.

Calich VLG, Pina A, Felonato M, et al. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2008; 53(1): 1–7.

Calich VL, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. British journal of experimental pathology, 1985; *66*(5): 585–94.

Camargo ZP, Berzaghi R, Amaral CC, Silva SH. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. Medical mycology, 2003; 41(6): 539–42.

Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. J Immunol, 2006; 177(9): 5811–18.

Chen F, Wu W, Millman A, et al. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. Nature immunology, 2014; 15(10): 938–46.

Chiarella AP, Arruda C, Pina A, Costa TA, Ferreira RCVV, Calich VLG G. The relative importance of CD4+ and CD8+T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. Microbes and Infection, 2007; 9(9): 1078–88.

Schauer C, Janko C, Munoz LE, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. Nature Medicine, 2014; 20(5): 511–17.

Corredor GG, Castaño JH, Peralta LA, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo Dasypus novemcinctus, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. Revista iberoamericana de micología,1999; 16(4): 216–20.

Coutinho ZF, Da Silva D, Lazera M, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude*, 2002;18(5): 1441–54.

Da Silva FC, Svidzinski TIE, Patussi EV, Cardoso CP, De Oliveira Dalalio MM, Hernandes L. Morphologic organization of pulmonary granulomas in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2009; 80(5): 798–04.

Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. Journal of Leukocyte Biology, 2007; 83(1): 64–70.

de Almeida, SM, Queiroz-Telles F, Doi EM, Ono M, Werneck LC. Anti-gp43 Antibodies in the Cerebrospinal Fluid of Patients With Central Nervous System Involvement by Paracoccidioidomycosis. American Journal of Clinical Pathology, 2002; 118(6): 864–68.

de Amorim J, Magalhães A, Muñoz JE, Rittner GMG, Nosanchuk JD, Travassos LR, Taborda CP. DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis induces long-term protection in presence of regulatory T cells. Microbes and Infection, 2013;15(3): 181–91.

De Camargo, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. Mycopathologia, 2008; 165(4–5): 289–302.

de Farias MR, Zeni Condas LA, Ribeiro MG, et al. Paracoccidioidomycosis in a Dog: Case Report of Generalized Lymphadenomegaly. Mycopathologia, 2011; 172(2): 147–52.

de Melo FM, Braga CJ, Pereira FV, et al. Anti-metastatic immunotherapy based on mucosal administration of flagellin and immunomodulatory P10. Immunology and cell biology, 2015; 93(1): 86–8.

De Oliveira HC, Assato PA, Marcos CM, et al. Paracoccidioides-host interaction: An overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. Frontiers in Microbiology, 2015; *6*(NOV): 1–20.

de Oliveira LL, Coltri KC, Barros Cardoso CR, Roque-Barreira MC, Panunto-Castelo A. T helper 1-inducing adjuvant protects against experimental paracoccidioidomycosis. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2008; 2(3): 1–5.

Del Negro GMB, Pereira CN, Andrade HF, et al.. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. Journal of Medical Microbiology, 2000; 49(1): 37–46.

Della Coletta AM, Bachiega TF, de Quaglia e Silva JC, et al. Neutrophil Extracellular Traps Identification in Tegumentary Lesions of Patients with Paracoccidioidomycosis and Different Patterns of NETs Generation In Vitro. PLoS Neglected Tropical

Diseases, 2015; 9(9): 1–19.

Dias MFRG, Filgueira AL, de Souza W. A morphological and cytochemical study of the interaction between *Paracoccidiodes brasiliensis* and neutrophils. Microscopy and microanalysis, 2004; 10: 215–23.

Do Valle AC, Costa RL, Fialho Monteiro PC, Von Helder J, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. Medical mycology, 2001; 39(4): 373–77.

Elias Costa MR, Da Silva Lacaz C, Kawasaki M, De Camargo ZP. Conventional versus molecular diagnostic tests. Medical Mycology, 2000; *38* (1): 139–45.

Fabris LR, Andrade ÚV, Santos AF, 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, 2014; 56(2): 121–25.

Feriotti C, Bazan SB, Loures FV, Araújo EF, Costa TA, Calich VLG. Expression of dectin-1 and enhanced activation of NALP3 inflammasome are associated with resistance to paracoccidioidomycosis. Frontiers in Microbiology, 2015; 6(SEP): 1–13.

Franco L, Najvar L, Gomez BL, Restrepo S, Graybill JR, Restrepo A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. The American journal of tropical medicine and hygiene, 1998; *58*(4): 424–30.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS. Paracoccidioidomycosis: A Recently Proposed Classification of Its Clinical Forms. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1987; *20*(2): 129–32.

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. Journal of Cell Biology, 2007; 176(2): 231–41.

Goihman-Yahr M, Essenfeld-Yahr E, de Albornoz MC, et al. Defect of in vitro digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. Infection and immunity, 1980; 28(2): 557–66.

Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, de Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. Journal of clinical microbiology, 2000; 38(9): 3478–80.

Gonzalez A. Innate Immune Response to the Dimorphic Fungal Pathogen Coccidioides: Molecular and Cellular Mechanisms. Journal of Clinical and Cellular Immunology, 2013.

Gonzalez A, De Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. Infection and Immunity, 2000; 68(5): 2546–52.

González A, Restrepo A, Cano LE. Pulmonary immune responses induced in BALB/c mice by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. Mycopathologia, 2008; 165(4–5): 313–30.

Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract

of three bats (Artibeus lituratus) in Colombia, S.A. Sabouraudia, 1965; 4(2): 124–5.

Hahn RC, Morato Conceição YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan JS. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. Mycoses, 2003; 46(8): 342–47.

Hebeler-Barbosa F, Morais FV, Montenegro MR, et al. Comparison of the Sequences of the Internal Transcribed Spacer Regions and PbGP43 Genes of *Paracoccidioides brasiliensis* from Patients and Armadillos (*Dasypus novemcinctus*). Journal of Clinical Microbiology, 2003; 41(12): 5735–37.

Herr R, Tarcha E, Taborda P, et al. Phylogenetic Analysis of Lacazia loboi Places This Previously Uncharacterized Pathogen within the Dimorphic Onygenales. Journal of Clinical Microbiology, 2001; 39(1): 309–14.

Iwai LK, Yoshida M, Sidney J, et al. In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* frequently recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized ind. Molecular medicine, 2003; 9(9–12): 209–19.

Jee J, Bonnegarde-Bernard A, Duverger A, et al. Neutrophils negatively regulate induction of mucosal IgA responses after sublingual immunization. Mucosal Immunology, 2015; *8*(4): 735–45.

Lincopan N, Espíndola NM, Vaz AJ, Costa MHB da, Faquim-Mauro E, Carmona-Ribeiro, A. M. Novel immunoadjuvants based on cationic lipid: Preparation, characterization and activity in vivo. Vaccine, 2009; *27*(42): 5760–71.

Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1983; 80(24): 7659–63.

Loures FV, Pina A, Felonato M, Araújo EF, Leite KRM, Calich VLG. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. Infection and Immunity, 2010; 78(3): 1078–88.

Loures FV, Pina A, Felonato M, Calich VLG. TLR2 Is a Negative Regulator of Th17 Cells and Tissue Pathology in a Pulmonary Model of Fungal Infection. The Journal of Immunology, 2009; *183*(2): 1279–90.

Low CY, Rotstein C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. F1000 Medicine Reports, 2011; *3*.

Magalhães A, Ferreira KS, Almeida SR, Nosanchuk JD, Travassos LR, Taborda CP. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. Clinical and Vaccine Immunology, 2012; 19(1): 23–9.

Marques-Da-Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, et al. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by detection of antigen and antibody in bronchoalveolar lavage fluids. Clinical and Vaccine Immunology, 2006; 13(12): 1363–66.

Marques AF, da Silva MB, Juliano MAP, Munhõz JE, Travassos LR, Taborda CP. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis.* Microbes and Infection, 2008;10(12–13): 1251–58.

Marques AF, Da Silva, MB, Juliano MAP, Travassos LR, Taborda CP. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006; 50(8): 2814–19.

Martinez R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2015; 57:11–20.

Matute DR. Cryptic Speciation and Recombination in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as Revealed by Gene Genealogies. Molecular Biology and Evolution, 2005; 23(1): 65–73.

Mayorga O, Muñoz JE, Lincopan N, et al. The role of adjuvants in therapeutic protection against paracoccidioidomycosis after immunization with the P10 peptide. Frontiers in Microbiology, 2012; 3.

McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. Cell Host and Microbe, 2012;12(3): 324–33.

Mejía SP, Cano LE, López JA, Hernandez O, González Á. Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides Brasiliensis*. Microbiology, 2015; 161: 1008–17.

Mistreta T, Souza MJ, Chamma LG, Pinho SZ, Franco M. Serology of paracoccidioidomycosis. I. Evaluation of the indirect immunofluorescent test. Mycopathologia, 1985; *89*(1): 13–7.

Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. The Journal of experimental medicine, 2013; *210*(7): 1283–99.

Moreto TC, Marques MEA, de Oliveira MLSC, Moris DV, de Carvalho L R, Mendes RP. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2011; 105(8): 473–78.

Mota NG, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MT, et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985; 79(6): 765–72.

Naranjo TW, Lopera DE, Diaz-Granados LR, Duque JJ, Restrepo MA, Cano LE. Combined itraconazole-pentoxifylline treatment promptly reduces lung fibrosis induced by chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in mice. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 2011; 24(1): 81–91.

Negroni R. Paracoccidioidomycosis (south american blastomycosis, lutz's mycosis). International Journal of Dermatology, 1993; 32(12): 847–59.

Peraçoli MTS, Kurokawa CS, Calvi SA, et al. Production of pro- and anti-

inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. Microbes and Infection, 2003; 5(5): 413–18.

Pina A, Hila P, Saldiva N, Elena L, Restrepo C, Calich VLG. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. Journal of Leukocyte Biology, 2006; 79(6): 1202–13.

Pino-Tamayo PA, Puerta-Arias JD, Lopera D, Urán-Jiménez ME, González Á. Depletion of Neutrophils Exacerbates the Early Inflammatory Immune Response in Lungs of Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. Mediators of Inflammation, 2016; 1–17.

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

Puerta-Arias JD, Pino-Tamayo PA, Arango JC, Gonzalez A. Depletion of neutrophils promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. PLoS ONE, 2016; 11(9): 1–23.

Queiroz-Telles F, Escuissato D. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 2011; 32(6): 764–74.

Reeves EP, Nagl M, Godovac-Zimmermann J, Segal AW. Reassessment of the microbicidal activity of reactive oxygen species and hypochlorous acid with reference to the phagocytic vacuole of the neutrophil granulocyte. Journal of Medical Microbiology, 2003; 52(8): 643–51.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. Sabouraudia, 1985; 23(5): 323–34.

Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? Medical mycology , 2001; 39(3): 233–41.

Rittner GMG, Muñoz JE, Marques AF, Nosanchuk JD, Taborda CP, Travassos LR. Therapeutic DNA Vaccine Encoding Peptide P10 against Experimental Paracoccidioidomycosis. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2012; 6(2): e1519.

Romani L. Immunity to fungal infections. Nat Rev Immunol, 2011; 11(4): 275–88.

Romani L, Puccetti P. Controlling pathogenic inflammation to fungi. Expert review of anti-infective therapy, 2007; 5(6): 1007–17.

Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Infection and Immunity, 1988; 56(3): 711–13.

San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. Medical mycology, 2002; 40(3): 225–42.

Santos PC, Santos DA, Ribeiro LS, et al. The Pivotal Role of 5-Lipoxygenase-Derived LTB4 in Controlling Pulmonary Paracoccidioidomycosis. PLoS Neglected

Tropical Diseases, 2013; 7(8).

Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycosis Treatment. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 2015; 57(1): 31–7.

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso em paracoccidioidomicose. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2006; 39(3): 297–310.

Silva DF, Assis CM, Zamboni IM, Barreto LC, Kohara VS, Vicentini-Moreira AP. Use of immunoblotting assay improves the sensitivity of paracoccidioidomycosis diagnosis. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2008; 14(2): 313–21.

Singer-Vermes, L. M., Sakamoto TN, Vaz CA, Calich VL. (1995). Influence of the genetic pattern and sex of mice in experimental paracoccidioidomycosis. Clinical and experimental immunology, 1995; 101(1): 114–20.

Souza AR, Gesztesi JL, Moraes JZ, et al. Evidence of idiotypic modulation in the immune response to gp43, the major antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in both mice and humans. Clinical and Experimental Immunology, 1998; 114(1): 40–8.

Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, Franco M, Travassos LR. 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, 1998; 66(2): 786–93.

Taborda CP, Urán ME, Nosanchuk JD, Travassos LR. Paracoccidioidomycosis: Challenges in the Development of a Vaccine Against an Endemic Mycosis in the Americas. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2015; 57(1): 21–4.

Teixeira MDM, Theodoro RC, Oliveira FFM, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. Medical Mycology, 2013; 1–10.

Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Felipe MSS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009; 52(2): 273–83.

Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. BMC microbiology, 2007; 7(1): 92.

Tessarolli V, Gasparoto TH, Lima HR, et al. Absence of TLR2 influences survival of neutrophils after infection with *Candida albicans*. Medical Mycology, 2010; 4*8*(1): 129–40.

Theodoro RC, Teixeira MDM, Felipe MSS, et al. Genus Paracoccidioides: Species Recognition and Biogeographic Aspects. PLoS ONE, 2012; 7(5): e37694.

Thomas CJ, Schroder K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. Trends in Immunology, 2013; 34(7): 317–28.

Trejo-Chávez A, Ramírez-Romero R, Ancer-Rodríguez J, Nevárez-Garza AMM, Rodríguez-Tovar LEE. Disseminated Paracoccidioidomycosis in a Southern Two-Toed Sloth (*Choloepus didactylus*). Journal of Comparative Pathology, 2011; *144*(2–3): 231–34.

Trentini MM, de Oliveira FM, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. The Role of Neutrophils in the Induction of Specific Th1 and Th17 during Vaccination against Tuberculosis. Frontiers in Microbiology, 2016; *7*(6): 1–13.

Untereiner WA, Scott JA, Naveau FA, Sigler L, Bachewich J, Angus A. The Ajellomycetaceae, a New Family of Vertebrate-Associated Onygenales. Mycologia, 2004; 96(4): 812.

Urban CF, Lourido S, Zychlinsky A. How do microbes evade neutrophil killing? Cellular Microbiology, 2006; 8(11): 1687–96.

Urban CF, Reichard U, Brinkmann ., Zychlinsky A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. Cellular Microbiology, 2006; 8(4): 668–76.

Verli FD, Marinho SA., Souza SC, Figueiredo MAZ, Yurgel LS. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2005; *38*(3): 234–37.

Vieira G de D, Alves T da C, Lima SMD, Camargo LMA, Sousa CM de. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2014; 47(1): 63–8.

Vilela R, Bossart GD, St. Leger JA, et al. Cutaneous granulomas in dolphins caused by Novel uncultivated *Paracoccidioides brasiliensis*. Emerging Infectious Diseases, 2016; 22(12): 2063–69.

Wojtasiak M, Pickett DL, Tate MD, et al. Depletion of Gr-1+, but not Ly6G+, immune cells exacerbates virus replication and disease in an intranasal model of herpes simplex virus type 1 infection. Journal of General Virology, 2010; 91(9): 2158–66.

Yang CW, Strong BSI, Miller MJ, Unanue ER. Neutrophils Influence the Level of Antigen Presentation during the Immune Response to Protein Antigens in Adjuvants. The Journal of Immunology, 2010; 185(5): 2927–34.