

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Tese de Doutorado

**EFEITO DAS CÉLULAS LEVEDURIFORMES DE *Paracoccidioides brasiliensis*  
RADIOATENUADAS NA VACINAÇÃO PROFILÁTICA E TERAPÊUTICA EM  
PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL**

Estefânia Mara do Nascimento Martins

**EFEITO DAS CÉLULAS LEVEDURIFORMES DE *Paracoccidioides brasiliensis*  
RADIOATENUADAS NA VACINAÇÃO PROFILÁTICA E TERAPÊUTICA EM  
PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Área de concentração: Ciências biológicas

Orientador: Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff

Coorientador: Prof. Dr. Antero Silva Ribeiro de Andrade

Coorientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda De Góes

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2012

Este trabalho foi realizado no laboratório de Microbiologia Médica, Departamento de Microbiologia e no laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Contou com a colaboração do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional da Energia Nuclear (CDTN/CNEN).

"Não somos o que gostaríamos de ser. Nós não somos o que ainda iremos ser, mas, graças a Deus, não somos mais quem nós éramos." (Martin Luther King Jr.)

À minha mãe e minha querida vovó Edna, com  
todo amor e carinho, por todo amor e carinho.

### AGRADECIMENTOS

Ao Deus, por me conceder a serenidade, perseverança e humildade nos momentos mais difíceis da vida.

À minha orientadora, professora Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff, pela oportunidade, confiança, disponibilidade, carinho e a todo o conhecimento transmitido. Muito obrigada!

Ao querido professor Dr. Alfredo Miranda de Góes, por toda dedicação, cuidado, amizade e serenidade. Pela orientação segura e admirável. Por todo o conhecimento transmitido, o qual contribuiu fortemente para o meu amadurecimento pessoal e profissional. Muito obrigada!

Ao professor Dr. Antero Silva Ribeiro de Andrade, muitíssimo obrigada por toda a confiança em todos esses anos de convivência, pelo incentivo constante, por todos os ensinamentos e orientação.

À minha mãe, Consuelo, pela honestidade, força e perseverança. Pelo exemplo de seriedade e compromisso com a vida. Por todo o amor, carinho e dedicação. Amo você!

Aos meus irmãos, Rafael e Lucas, pela amizade, presença, apoio e incentivo.

À Cacá pelo incentivo diário, pelos conselhos sempre muito sensatos e pela amizade.

À vovó Edna pela presença constante, pela ajuda indispensável, por todo amor, carinho, paciência e amizade.

À Letícia e Juju pinga fogo por encherem minha vida de amor e alegria. A Lívinha que acabou de chegar à família e ao Gabriel que está por vir.

Ao Raphael, meu amor, pela presença agradável, por todo apoio e incentivo, pela imensa ajuda nesta fase final do meu doutorado. Com você eu enfrentei esta etapa com mais perseverança e tranquilidade.

À toda minha família pelo apoio e carinho.

À Vivi, minha companheira, muitíssimo obrigada pela amizade sincera e por toda ajuda. Você é uma grande amiga. Te adoro!!!

À Elis, PbZeti de maior qualidade. Muito obrigada por toda a sua ajuda, pela presença constante e pela amizade.

As grandes amigas Adriana, Marininha, Cíntia e Luiza. Muito obrigada pela amizade sincera, pelo carinho e por todo incentivo.

Ao professor Dr. Dawidson Assis Gomes pela grande disponibilidade, atenção e cuidado conosco e com o laboratório.

## AGRADECIMENTOS

---

A todos os colegas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular: Alessandra Marques, Anne, Ana Cláudia, Alexandra, Ana Carolina, Bê, Carininha, Cris, Carolzinha, Carol Angelis, Eliza, Inácio, Ju Lott, Jonas, Jerusa, Laura, Lelê, Lílian, Mariana, Michelle, Maira, Naíra, Natássia, Natália, Pedro, Pablo, Silviene, Tércio, Thaísinha, Tiago... pelas conversas, pela convivência, pelo carinho e pela alegria constante.

À querida Betinha, pelo carinho, paciência, dedicação e disponibilidade. Muito obrigada!

À Peú, pelo auxílio, de fundamental importância, com os camundongos.

A todos os colegas do laboratório de Micologia, em especial ao Professor Dr. Daniel de Assis Santos, Ludmila e Érika.

À Jankerle pela atenção, disponibilidade e enorme ajuda na identificação das lâminas histológicas.

À professora Jerlusa e ao Chico pela ajuda na confecção das lâminas de histologia.

Aos colegas do doutorado, em especial à Quel, Renata, Piló, Nat, João, Simone, Milan e Rafael que me encheram de alegria em um momento muito especial da minha vida.

A todos os professores da pós-graduação pela qualidade dos ensinamentos.

Ao CDTN pelas oportunidades e a todos os amigos pela convivência agradável durante todos esses anos. Em especial, ao Vlamir, Nelson, Sulfeto, Romário e Bárbara pelas caminhadas, viagens e risadas.

Às amigas Lu, Marina, Pol, Quel, Camila, sempre presentes em minha vida.

Aos amigos da faculdade Raquel, Ciça, Giancarlo, Andréa, Michele, Patrícia e Fernando pelos momentos agradáveis.

Aos Deuses e aos amigos dos Deuses, em especial à Nat, Fê e Livinha, pelas confusões que me fizeram esquecer o estresse do dia a dia.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho. Muito obrigada!!!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	XII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XVI
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b> .....	XXII
<b>RESUMO</b> .....	XXII
<b>ABSTRACT</b> .....	XXIII
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Paracoccidioidomicose: Um Breve Histórico.....	2
1.2 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	2
1.3 Paracoccidioidomicose (PCM).....	7
1.3.1 Epidemiologia.....	7
1.3.2 Patogenia da PCM.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
1.3.3 Resposta imunológica.....	9
1.3.3.1 Imunidade inata .....	10
1.3.3.2 Imunidade adquirida.....	11
1.3.3.2.1 Imunidade celular .....	11
1.3.3.2.2 Imunidade humoral.....	12
1.3.3.3 Reação granulomatosa.....	13
1.3.4 Diagnóstico.....	14
1.3.5 Tratamento.....	16
1.3.5.1 Tratamento das infecções fúngicas.....	16
1.3.5.2 Esquema terapêutico na PCM .....	17
1.3.6 Imunógenos protetores em PCM.....	18
<b>II. JUSTIFICATIVA</b> .....	24

---

<b>III. OBJETIVOS</b> .....	27
3.1 Objetivo geral .....	28
3.1.1 Objetivos específicos.....	28
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
FLUXOGRAMA DA TESE.....	30
4.1 Camundongos .....	31
4.2 Microgarnismo .....	31
4.3 Avaliação da viabilidade celular.....	39
4.4 Recuperação da virulência de <i>P. brasiliensis</i> .....	39
4.5 Avaliação da perda da capacidade infecciosa da LevRad .....	32
4.6 Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade imunogênica da LevRad em macrófagos peritoneais.....	34
4.6.1 Isolamento e cultivo de macrófagos do exsudato peritoneal .....	34
4.6.2 Infecção <i>ex vivo</i> da cultura de macrófagos murinos.....	35
4.6.3 Avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais .....	35
4.6.4 Determinação da produção de óxido nítrico (NO) .....	37
4.6.5 Dosagem de citocinas por ELISA .....	35
4.6.6 Avaliação da capacidade fungicida de macrófagos murinos.....	36
4.7 Avaliação <i>in vivo</i> da capacidade imunogênica da LevRad.....	37
4.7.1 Imunizações pelas vias endovenosa (i.v.) e subcutânea (s.c.) .....	38
4.7.2 Infecção Intratraqueal (i.t.) .....	38
4.7.3 Determinação das UFC.....	38
4.7.4 Histologia .....	39
4.7.5 Proliferação de esplenócitos .....	39
4.7.6 Obtenção dos soros de camundongos .....	40

---

4.7.7 Preparação do exoantígeno de <i>P. brasiliensis</i> (MEXO).....	40
4.7.8 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.....	40
4.7.9 ELISA.....	41
4.7.10 Detecção de citocinas por PCR em tempo real .....	41
4.7.11 Dosagem de citocinas por ELISA .....	42
4.8 Avaliação do potencial da vacinação terapêutica.....	43
4.9 Análise estatística .....	45
<b>V. RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
5.1 Avaliação da perda da capacidade infecciosa da LevRad.....	47
5.1.1 Determinação das UFC.....	47
5.1.2 Análises histopatológicas dos órgãos dos camundongos infectados.....	49
5.1.3 Sumário dos resultados.....	52
5.2 Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade imunogênica da LevRad em macrófagos peritoneais.....	53
5.2.1 Índice fagocítico de macrófagos peritoneais desafiados <i>in vitro</i> com a LevRad...53	
5.2.2 Dosagem de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais ativados e desafiados .....	64
5.2.3 Perfil de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais ativados e desafiados .....	57
5.2.4 Capacidade fungicida de macrófagos peritoneais desafiados <i>in vitro</i> com a LevRad.....	64
5.2.5 Sumário dos resultados.....	67
5.3 Avaliação do potencial profilático da LevRad em PCM experimental.....	68
5.3.1 Determinação das UFC.....	69
5.3.2 Análise histopatológica dos órgãos dos animais imunizados.....	71
5.3.3 Reatividade de IgG anti-Mexo nos soros dos camundongos imunizados .....	74

---

5.3.4 Produção de anticorpos IgG anti-Mexo nos soros dos camundongos imunizados e desafiados.....	76
5.3.5 Determinação de IgG1, IgG2a e IgG2b anti-Mexo nos soros dos camundongos imunizados e desafiados .....	78
5.3.6 Efeito da LevRad na proliferação celular .....	80
5.3.7 Níveis transcritos de citocinas e da enzima iNOS em camundongos infectados e tratados.....	83
5.3.8 Determinação por ELISA do perfil de citocinas em resposta a LevRad .....	92
5.3.9 Sumário dos resultados .....	97
5.4 Avaliação do potencial terapêutico da LevRad em PCM experimental.....	99
5.4.1 Determinação das UFC .....	99
5.4.2 Análise histopatológica nos órgãos dos animais infectados e tratados .....	101
5.4.3 Determinação de IgG total anti-Mexo nos soros dos camundongos infectados e tratados.....	104
5.4.4 Determinação de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-Mexo nos soros dos camundongos infectados e tratados .....	106
5.4.5 Níveis transcritos de citocinas e da enzima iNOS em camundongos infectados e tratados.....	108
5.4.6 Sumário dos resultados .....	115
<b>VI. DISCUSSÃO</b> .....	117
<b>VII. CONCLUSÃO</b> .....	130
<b>VIII. PERSPECTIVAS</b> .....	132
<b>IX. REFERÊNCIAS</b> .....	134
<b>X. ANEXOS</b> .....	150

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>BHI</b>	Meio infuso cérebro coração (do inglês: Brain heart infusion)
<b>CD</b>	(do inglês: Cluster of differentiation)
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CETEA</b>	Comitê de ética em experimentação animal
<b>CDTN</b>	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
<b>CNEN</b>	Comissão Nacional de Energia Nuclear
<b>Co</b>	Cobalto
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico
<b>ConA</b>	Concanavalina A
<b>c.p.m</b>	Contação por minuto
<b>Ct</b>	Ciclo limiar (do inglês: Threshold cycle)
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico (do inglês: Desoxyribonucleic acid)
<b>D.O</b>	Densidade ótica
<b>DTH</b>	Reação de hipersensibilidade tardia (do inglês: Delayed-type hypersensitivity)
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra acético (do inglês: Ethylenediamine tetraacetic acid)
<b>ELISA</b>	Ensaio de absorção imunoenzimático (do inglês: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
<b>ePb18</b>	Extrato de <i>P. brasiliensis</i> não irradiado
<b>ePb18*</b>	Extrato de <i>P. brasiliensis</i> irradiado
<b>F0</b>	Fração 0 de PbAg
<b>F1</b>	Fração 1 de PbAg
<b>FIII</b>	Fração 3 de PbAg
<b>Gy</b>	Gray
<b>g</b>	Grama
<b>Gp43</b>	Glicoproteína
<b>h</b>	Hora
<b>H<sup>3</sup>-Tritiada</b>	Timidina tritiada

---

<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HE</b>	Hematoxilina eosina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintetase induzida (do inglês: inducible nitric oxide synthase)
<b>i.m.</b>	Intramuscular
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.v.</b>	Intravenosa
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama (do inglês: Interferon-gamma)
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>kGy</b>	Kilo Gray
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>L</b>	Litro
<b>LIG</b>	Laboratório de irradiação gama
<b>L</b>	Forma leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>
<b>LevRad</b>	Células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> irradiado
<b>M</b>	Forma micelial de <i>P. brasiliensis</i>
<b>MEXO</b>	Antígenos de membrana e secretados
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês: Major histocompatibility complex)
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>min</b>	Minuto
<b>NK</b>	Célula matadora natural (do inglês: Natural killer cell)
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>Nm</b>	Nanômetro
<b>NO</b>	Óxido nítrico (do inglês: Nitric oxide)
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>Pb</b>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

---

<b>Pb18</b>	Cepa de <i>P. brasiliensis</i>
<b>Pb27r</b>	Proteína recombinante de 27 kDa de <i>P. brasiliensis</i>
<b>Pb40r</b>	Proteína recombinante de 40 kDa de <i>P. brasiliensis</i>
<b>P10</b>	Peptídeo sintético de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<b>PbAg</b>	Antígeno somático de leveduras de <i>P. brasiliensis</i>
<b>PBMC</b>	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês: Peripheral blood mononuclear cells)
<b>PBS</b>	Tampão salina fosfato (do inglês: Phosphate buffer solution)
<b>PCM</b>	Paracoccidioidomicose
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: Polymerase chain reaction)
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>q.s.p</b>	Quantidade suficiente para
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio (do inglês: Reactive oxygen species)
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico (do inglês: Ribonucleic acid)
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>RPMI</b>	Meio de cultura de tecido animal desidratado (do inglês: Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium)
<b>s.c.</b>	Subcutânea
<b>TGF-β</b>	Fator de crescimento tumoral (do inglês: Transforming growth factor beta)
<b>TH</b>	Células T-auxiliares (do inglês: T helper)
<b>TH1</b>	Células T auxiliares do tipo 1 (do inglês: T helper cells type 1)
<b>TH2</b>	Células T auxiliares do tipo 2 (do inglês: T helper cells type 2)
<b>TMB</b>	(do inglês: 3, 3', 5, 5'- tetramethylbenzidine)
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: Tumor necrosis factor-alpha)
<b>U</b>	Unidade
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de colônia
<b>V</b>	Volume

<b>YPD</b>	Meio composto de extrato de levedura peptona de carne e D-glicose (do inglês: Yeast Peptone Dextrose)
<b>μM</b>	Micrômetro
<b>μL</b>	Microlitro

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 - Formas morfológicas de <i>P. brasiliensis</i> . (A) Forma M: hifas delgadas, septadas e ramificadas com conídeas intercalares e terminais; (B) Forma L: leveduras arredondadas agrupadas periféricamente à célula mãe.	04
Quadro 1 - Grupos de animais imunocompetentes e imunodeprimidos utilizados na avaliação da perda da infectividade da LevRad	33
Figura 2 - Determinação de UFC nos órgãos dos camundongos imunocompetentes (A) e imunodeprimidos (B) infectados com a LevRad.	48
Figura 3 - Curva de sobrevivência dos camundongos Nude após infecção com <i>P. brasiliensis</i> irradiado (LevRad) ou não irradiado (C+).	49
Figura 4 - Histopatologia representativa das lesões causadas pelo <i>P. brasiliensis</i> irradiado (LevRad) e não irradiado (C+) no pulmão dos camundongos imunodeprimidos BALB/c*.	51
Figura 5 - Histopatologia representativa dos órgãos (pulmão, baço e fígado) dos camundongos imunocompetentes BALB/c infectados com a LevRad, analisados 30 dias depois.	51
Figura 6 - Histopatologia representativa das lesões causadas pelo <i>P. brasiliensis</i> não irradiado nos órgãos (pulmão, baço e fígado) dos camundongos imunocompetentes BALB/c infectados por via intratraqueal e endovenosa.	52
Figura 7 - Índice fagocítico (IF) de macrófagos ativado com o IFN- $\gamma$ após o desafio in vitro com as células leveduriformes viáveis de <i>P. brasiliensis</i> irradiado (LevRad) e não irradiado (Pb18).	54
Figura 8 - Imagem ilustrativa das leveduras de <i>P. brasiliensis</i> fagocitadas por macrófagos peritoneais ativado ou não com o IFN- $\gamma$ e cultivado na ausência ou presença de estímulo (Pb18 ou LevRad)	55

---

Figura 9 -	Concentração de NO <sup>2-</sup> no sobrenadante de cultura dos macrófagos peritoneais pré-ativados com o IFN- $\gamma$ após desafio <i>in vitro</i> com as células leveduriformes viáveis de <i>P. brasiliensis</i> irradiado (LevRad) e não irradiado (Pb18).	57
Figura 10 -	Nível de TNF- $\alpha$ presente no sobrenadante de cultura dos macrófagos pré-ativados com o IFN- $\gamma$ após desafio com as células leveduriformes viáveis de <i>P. brasiliensis</i> irradiado (LevRad) ou com o fungo não irradiado (Pb18).	59
Figura 11-	Nível de IFN- $\gamma$ presente no sobrenadante de cultura dos macrófagos pré-ativados com o IFN- $\gamma$ após desafio com as células leveduriformes viáveis de <i>P. brasiliensis</i> irradiado (LevRad) ou com o fungo não irradiado.	60
Figura 12 -	Nível de IL-12 presente no sobrenadante de cultura dos macrófagos pré-ativados com o IFN- $\gamma$ após desafio com as células leveduriformes viáveis de <i>P. brasiliensis</i> irradiado (LevRad) ou com o fungo não irradiado.	61
Figura 13 -	Nível de IL-10 presente no sobrenadante de cultura dos macrófagos pré-ativados com o IFN- $\gamma$ após desafio com as células leveduriformes viáveis de <i>P. brasiliensis</i> irradiado (LevRad) ou com o fungo não irradiado.	62
Figura 14 -	Nível de IL-4 presente no sobrenadante de cultura dos macrófagos pré-ativados com o IFN- $\gamma$ após desafio com as células leveduriformes viáveis de <i>P. brasiliensis</i> irradiado (LevRad) ou com o fungo não irradiado.	63
Figura 15-	Determinação das UFC no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais pré-ativados com o IFN- $\gamma$ e desafiados <i>in vitro</i> com as células leveduriformes viáveis de <i>P. brasiliensis</i> irradiado e não irradiado	65
Figura 16 -	Imagens representativas das colônias de <i>P. brasiliensis</i> recuperadas do lisado dos macrófagos peritoneais.	66
Figura 17 -	Determinação de UFC nos órgãos (pulmão, baço e fígado) dos camundongos BALB/c imunizados via endovenosa ou subcutânea, duas ou três vezes	70

---

	consecutivas, com a LevRad.	
Figura 18 -	Histopatologia representativa dos órgãos dos camundongos BALB/c analisados 30 e 90 dias após o desafio com o <i>P. brasiliensis</i> não irradiado.	72
Figura 19 -	Histopatologia representativa dos órgãos dos camundongos BALB/c imunizados com a LevRad.	73
Figura 20 -	Detecção de anticorpos anti-Mexo em camundongos BALB/c imunizados com a LevRad e desafiados.	75
Figura 21 -	Perfil de IgG anti-Mexo nos soros dos camundongos BALB/c imunizados com LevRad e desafiados.	77
Figura 22 -	Perfil de IgG1, IgG2a e IgG2b anti-Mexo nos soros dos camundongos BALB/c imunizados com a LevRad e desafiados.	79
Figura 23 -	Proliferação de esplenócitos estimulada por antígenos de <i>P. brasiliensis</i> (ePb18 e ePb18*).	81
Figura 24 -	Proliferação de esplenócitos induzida por antígenos de <i>P. brasiliensis</i> (ePb18 e ePb18*) analisada 30 (A) e 90 (B) dias após o desafio.	82
Figura 25 -	Expressão relativa de citocinas nos pulmões dos camundongos imunizados.	85
Figura 26 -	Expressão relativa de IFN- $\gamma$ nos pulmões dos camundongos imunizados e desafiados.	86
Figura 27 -	Expressão relativa de TNF- $\alpha$ nos pulmões dos camundongos imunizados e desafiados.	87
Figura 28	Expressão relativa de iNOS nos pulmões dos camundongos imunizados e desafiados.	88
Figura 29 -	Expressão relativa de IL-10 nos pulmões dos camundongos imunizados e desafiados.	89
Figura 30 -	Expressão relativa de TGF- $\beta$ nos pulmões dos camundongos imunizados e desafiados.	90
Figura 31 -	Expressão relativa de IL-4 nos pulmões dos camundongos imunizados e desafiados.	91
Figura 32 -	Nível de IFN- $\gamma$ presente no sobrenadante de cultura dos esplenócitos de camundongos imunizados	93

---

Figura 33 -	(LevRad). Nível de IFN- $\gamma$ presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados e desafiados (LevRad*).	94
Figura 34 -	Nível de IL-10 presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados e desafiados (LevRad*).	95
Figura 35 -	Nível de IL-4 presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados e desafiados (LevRad*).	96
Figura 36 -	Determinação das UFCs nos órgãos (pulmão, fígado e baço) dos camundongos BALB/c infectados e, posteriormente, tratados.	100
Figura 37 -	Histopatologia representativa dos órgãos (pulmão, baço e fígado) dos camundongos BALB/c que não sofreram qualquer intervenção (C-).	102
Figura 38 -	Histopatologia representativa dos órgãos (pulmão e fígado) dos camundongos BALB/c infectados e tratados.	102
Figura 39 -	Histopatologia representativa dos órgãos (pulmão) dos camundongos BALB/c infectados com as células leveduriformes viáveis de <i>P. brasiliensis</i> virulento não irradiado.	103
Figura 40 -	Histopatologia representativa dos órgãos (pulmão) dos camundongos BALB/c infectados e tratados com a LevRad associada ou não ao fluconazol.	104
Figura 41 -	Detecção de IgG anti-Mexo nos soros dos animais infectados e, posteriormente imunizados com a LevRad associada ou não ao fluconazol.	105
Figura 42 -	Perfil de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-Mexo nos soros dos camundongos BALB/c infectados e, posteriormente imunizados com a LevRad associada ou não ao fluconazol.	107
Figura 43 -	Expressão relativa de IFN- $\gamma$ nos pulmões dos camundongos infectados e tratados.	109
Figura 44 -	Expressão relativa de IL-10 nos pulmões dos camundongos infectados e tratados.	110

Figura 45 -	Expressão relativa de iNOS nos pulmões dos camundongos infectados e tratados.	111
Figura 46 -	Expressão relativa de TNF- $\alpha$ nos pulmões dos camundongos infectados e tratados.	112
Figura 47 -	Expressão relativa de TGF- $\beta$ nos pulmões dos camundongos infectados e tratados.	113
Figura 48-	Expressão relativa de IL-4 nos pulmões dos camundongos infectados e tratados.	114

<b>LISTA DE TABELAS</b>		<b>Página</b>
TABELA 1 -	Esquema experimental para a avaliação da perda da infectividade da LevRad	33

---

**RESUMO**

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico causador da paracoccidioidomicose (PCM), principal micose sistêmica da América Latina. Até o momento, não há vacina para essa enfermidade. Dependendo da gravidade da doença e do antifúngico de escolha, o tratamento pode ser prolongado e apresentar altos índices de reativação da doença. Assim, a busca por novas alternativas profiláticas e/ou terapêuticas eficazes continua. Neste trabalho, células leveduriformes de *P. brasiliensis* atenuadas por irradiação gama (LevRad) foram avaliadas, *in vitro* e *in vivo*, quanto ao seu potencial imunogênico frente ao fungo patogênico *P. brasiliensis* (Pb18). Inicialmente, a capacidade imunogênica da LevRad foi avaliada *in vitro* em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c ativados ou não com o IFN- $\gamma$  recombinante e desafiados ou não em cultura com a LevRad, a partir de ensaios para determinar o índice fagocítico, a atividade fungicida, a concentração de NO e a secreção de citocinas. A eficácia da vacinação profilática foi avaliada em camundongos BALB/c imunizados com a LevRad, duas ou três vezes consecutivas pela via intravenosa (i.v.) ou subcutânea (s.c.), 30 e 90 dias após o desafio intratraqueal (i.t.) com o *P. brasiliensis* não irradiado (Pb18). O potencial da vacinação terapêutica também foi avaliado 60 e 120 dias após a infecção i.t. com o Pb18, em camundongos BALB/c imunizados i.v. com a LevRad e/ou tratados com o fluconazol (InRad, InRadMed e InMed). Os órgãos (pulmão, baço e fígado) foram utilizados para a detecção das unidades formadoras de colônias (UFC), análises histopatológicas, proliferação celular e dosagem de citocinas. Os soros coletados foram utilizados para avaliação da eficácia da imunização e do perfil de IgG total e seus isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Os resultados demonstram o potencial imunogênico da LevRad *in vitro* e ressaltam o potencial do uso da LevRad em uma formulação anti-*P. brasiliensis* protetora capaz de evitar o estabelecimento da doença ou reduzir os efeitos de morbidade associados à PCM.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*; Paracoccidioidomicose; irradiação gama; vacina profilática; vacina terapêutica.

---

**ABSTRACT**

*Paracoccidioides brasiliensis* is a dimorphic fungus that causes paracoccidioidomycosis (PCM), the main systemic mycosis in Latin America. So far, there is no vaccine for this disease. Depending on the severity of the disease and the chosen antifungal therapy may be prolonged and have high rates of relapse. Thus, the search for new alternative prophylactic and/or effective treatment is needed. In this regard, yeast cells of *P. brasiliensis* (Pb18) attenuated by gamma irradiation (LevRad) have been evaluated for their immunogenic potential. First, the immunogenic capacity of LevRad was assessed *in vitro* in peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice activated or not in culture with recombinant IFN- $\gamma$ , and challenged with LevRad or unirradiated *P. brasiliensis* (Pb18), in tests for determining phagocytic activity, capacity fungicide, concentration of NO and secretion of cytokines. The efficacy of prophylactic vaccination was assessed in BALB/c mice immunized with LevRad, and two routes of immunization were tested, intravenous (i.v.) and subcutaneous (s.c.), varying the number of immunizations (two or three consecutive times). The protective response was measured 30 and 90 days after intratracheal (i.t.) challenge with Pb18. The potential of therapeutic vaccination was also evaluated 60 and 120 days after infection with Pb18 in BALB/c mice treated by i.v. immunization with LevRad and/or fluconazole. Organs (lungs, spleen and liver) were used for the detection of colony forming units (CFU), histopathologic analyzes, cell proliferation and cytokine. The sera were used to evaluate the efficacy of immunization and the profile of total IgG and its isotypes IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3. LevRad was able to stimulate phagocytosis *in vitro*, the secretion of high levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 and NO production. The results demonstrate the potential immunogenicity of LevRad *in vitro* and highlight the potential use of LevRad in a formulation anti-*P. brasiliensis* protective, capable of preventing the establishment of the disease or reducing morbidity associated with the PCM.

**Keywords:** paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides brasiliensis*; Gamma irradiation; therapeutic vaccine; prophylactic vaccine.

**I. INTRODUÇÃO**

### 1.1 Paracoccidioidomicose: Um Breve Histórico

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção fúngica granulomatosa e sistêmica, descrita inicialmente em 1908, na cidade de São Paulo (Estado de São Paulo, Brasil) por Adolf Lutz (1855-1940).

Em 1912, ainda em São Paulo, Afonso Splendore (1871-1953) cultivou o fungo e a partir de estudos micológicos e histológicos, associados aos novos dados clínicos sobre a doença, o caracterizou morfológica e biologicamente (LACAZ, 1982).

Floriano Paulo de Almeida (1898-1977), em estudo comparativo, demonstrou a diferença entre a paracoccidioidomicose e a coccidioidomicose, estabelecendo um novo gênero, *Paracoccidioides*, dentro do reino Fungi. O agente etiológico da PCM passou a ser denominado, a partir de 1930, *Paracoccidioides brasiliensis*, de acordo com as regras de nomenclatura de Linneu (ALMEIDA, 1930).

Essa micose profunda recebeu várias denominações (Blastomicose Brasileira, Blastomicose Sul-Americana, Granuloma Paracoccidióidico, Granulomatose Paracoccidióidica, Granuloma Ganglionar Maligno de origem blastomicética, Adenomicose, Doença de Lutz, Doença de Lutz Splendore-Almeida), porém a expressão Paracoccidioidomicose foi oficialmente consagrada em 1971, em Medellin (Colômbia) (LACAZ, 1991).

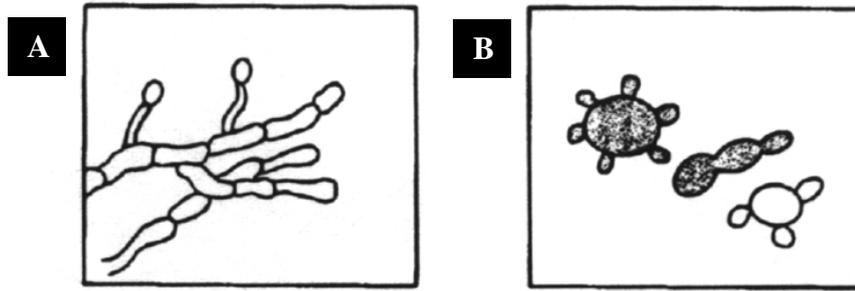
### 1.2 *Paracoccidioides brasiliensis*

*P. brasiliensis* é um fungo termodimórfico e assexuado, causador da PCM (ALMEIDA, 1930). Comparações filogenéticas, baseadas na subunidade ribossomal 28S, classificaram esse agente como pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Plectomyceto, ordem Onygenales e família Onygenacea, juntamente com os fungos *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Blastomyces dermatidis* (SAN-BLAS & NINO-VEGA, 2008).

Por muito tempo esse patógeno foi considerado uma entidade biológica única até que se propuseram três espécies filogenéticas distintas dentro de *P. brasiliensis* (MATUTE *et al.*, 2006): S1 (um grupo parafilético com 38 isolados de origem argentina, brasileira, peruana, paraguaia e venezuelana), PS2 (contendo 6 isolados, cinco deles de origem brasileira e um venezuelano) e PS3 (contendo 21 isolados colombianos). Recentemente, foi identificado um grupo com 17 amostras similares genotipicamente, que não apresentou relação com as espécies descritas acima (S1, PS2 e PS3), dentre elas a amostra brasileira Pb01. Baseados nesses achados e, em evidências anteriores (CARRERO *et al.*, 2008), essa linhagem foi considerada uma nova espécie dentro do complexo *Paracoccidioides*, passando a ser denominada - *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem a Adolfo Lutz. Essa nova espécie é endêmica na região centro oeste brasileira, mais especificamente, nos Estados de Goiás e Mato Grosso do Sul (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

O habitat natural do fungo *P. brasiliensis* ainda não está bem estabelecido, mas acredita-se que o fungo viva saprofiticamente à temperatura ambiente (17-28 °C), sob a forma micelial (M), em solo úmido e ácido com vegetação abundante e clima temperado. A forma M caracteriza-se pela formação de colônias brancas de crescimento lento que aderem firmemente ao substrato. Apresentam, microscopicamente, hifas delgadas, septadas e ramificadas, apresentando clamidoconídias intercalares ou terminais em dimensões que possibilitam sua chegada ao alvéolo pulmonar (Fig. 1A) (TONELLI & FREIRE, 2000). Arthroconídias, aleurioconídias e arthroaleurioconídias também já foram demonstradas nessa forma (EDWARDS *et al.*, 1991).

No hospedeiro, a 37 °C adquire a forma leveduriforme (L), sendo esse processo reversível. Morfologicamente, as leveduras apresentam-se arredondadas, com 5 a 25 µm de diâmetro, dupla parede birrefringente, com ou sem gemulação, isoladas ou agrupadas ao redor da célula mãe (Fig. 1B). Esta esporulação múltipla que caracteriza o *P. brasiliensis* em sua vida parasitária se assemelha ao aspecto típico de “roda de leme” (TONELLI & FREIRE, 2000). Em meio de cultura enriquecido com nutrientes o fungo apresenta colônias de aspecto rugoso ou cerebriforme e coloração creme.

Figura 1 - Formas morfológicas de *P. brasiliensis*.

Legenda: (A) Forma M: hifas delgadas, septadas e ramificadas com conídeas intercalares e terminais;  
(B) Forma L: leveduras arredondadas agrupadas com gemulação isolada ou agrupadas perifericamente à célula mãe.

Fonte: TONELLI & FREIRE, 2000

Esse fungo já foi isolado em solos de matas usadas para o plantio de café em áreas endêmicas como o Brasil, Argentina e Venezuela. Além disso, o fungo já foi isolado de ração para cães (FERREIRA *et al.*, 1990), em fezes de pinguins (GEZUELE, 1989) e, em vísceras de morcegos frutíferos, tatus e cães (Grosse, 1965; BAGAGLI *et al.*, 1998; RICCI *et al.*, 2004). Há relatos de PCM em tatus, *Dasypus novemcinctus*, capturados numa região de densa floresta tropical úmida no estado do Pará (NAIFF *et al.*, 1986) e em uma região endêmica da cidade de Botucatu, São Paulo (BAGAGLI *et al.*, 1998; SILVA VERGARA *et al.*, 2000). A PCM infecção também já foi detectada em exames histopatológicos e sorológicos de cadelas adultas da raça Doberman (RICCI *et al.*, 2004). Mais recentemente, houve um caso comprovado da doença em um felino (GONZALEZ *et al.*, 2010) e em um bicho preguiça da espécie *Choloepus didactylus* (TREJOCHAVEZ *et al.*, 2011). Em função disso, além da espécie humana, tatu e cães têm sido considerados possíveis reservatórios naturais e hospedeiros silvestre do *P. brasiliensis*.

Acredita-se que no solo e em detritos vegetais, o fungo sob condições de stress celular, principalmente devido à privação nutricional, produz conídeas que, quando separados do micélio parental, exibem dimorfismo dependendo da temperatura em que se encontram (BUSTAMANTE-SIMON *et al.*, 1985; RESTREPO *et al.*, 1986; RESTREPO *et al.*, 1988). Essa variação morfológica do *P. brasiliensis*, dependente da temperatura, é acompanhada da variação na proporção e no arranjo espacial entre os polissacarídeos,  $\alpha$ -(1,3)-glucana e  $\beta$ -(1,3)-glucana, presentes em sua parede celular (RESTREPO *et al.*, 1984; SAN BLAS *et al.*, 1987). Na forma saprofítica do fungo, a

---

parede celular possui, principalmente, o polímero de glicose  $\beta$ -(1,3)-glucana, enquanto que na sua forma parasitária há uma predominância de  $\alpha$ -(1,3)-glucana (SAN BLAS *et al.*, 1977; FRANCO, 1986; HOGAN *et al.*, 1996). Segundo SAN-BLAS & SAN BLAS (1982) a existência de grande quantidade de  $\alpha$ -(1,3)-glucana na parede celular está associada à virulência do fungo, a qual é atenuada quando o microrganismo é subcultivado por um longo período de tempo. Por outro lado, a passagem da amostra atenuada em animais ou o seu cultivo em meio suplementado com soro fetal bovino restabelece os níveis de  $\alpha$ -(1,3)-glucana e o fungo readquire sua virulência inicial (FRANCO, 1986).

A capacidade de sobreviver e replicar-se a 37° C é uma propriedade comum entre os fungos patogênicos. Esse fenômeno conhecido como termo-tolerância está correlacionado com a síntese de proteínas de choque térmico, já descritas em *P. brasiliensis*. A produção dessas proteínas parece exercer um importante papel não só na termo-adaptação, mas também na transição de micélio para levedura, essencial à patogênese do fungo (GOLDANI *et al.*, 1994).

Outros fatores de virulência que favorecem o estabelecimento da doença, sua disseminação e gravidade, além dos constituintes da parede celular, da capacidade termo tolerante e do dimorfismo morfológico apresentado pelo fungo *P. brasiliensis*, incluem a sensibilidade aos hormônios femininos, indução da síntese de leucotrienos, produção de melanina e a ação das glicoproteínas gp43, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) e serina – tiol na membrana extracelular dos tecidos de mamíferos (SAN BLAS & SAN BLAS 1993; HOGAN *et al.*, 1996; PUCCIA *et al.*, 1999).

Durante a fase da puberdade, onde há imaturidade sexual, a doença é equivalente em ambos os sexos (FRANCO, 1986). Porém, na fase adulta, a paracoccidiodomicose é mais freqüente no sexo masculino. A resistência das mulheres à doença parece estar relacionada a fatores hormonais (BRUMMER *et al.*, 1990). Hormônios femininos, como o estrógeno 17 -  $\beta$  - estradiol (E2), se ligam com alta afinidade e especificidade às proteínas citosólicas do *P. brasiliensis* inibindo a transformação do micélio em levedura (HOGAN *et al.*, 1996; RESTREPO *et al.*, 1988).

A adesão de microrganismos patogênicos às células do hospedeiro e à superfície da mucosa é outro passo fundamental no estabelecimento da infecção (VICENTINI *et*

---

*al.*, 1994). Os componentes da membrana basal da matriz extracelular (MEC) de tecidos de mamíferos, tais como laminina, fibronectinas e colágeno têm sido identificados como alvos para adesão do *P. brasiliensis* (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2000). A glicoproteína de superfície celular (gp43), principal antígeno secretado pelo fungo, é uma molécula mediadora na ligação do fungo à laminina (VICENTINI *et al.*, 1994). Essa interação entre os receptores específicos localizados na membrana das células do hospedeiro e seu ligante complementar presente na superfície do microrganismo favorece a adesão e invasão de macrófagos pelo *P. brasiliensis*, bem como estimula a sua replicação e disseminação nos tecidos (FRANCO, 1986; VICENTINI *et al.*, 1994). Além disso, de acordo com Popi e colaboradores (2002), a gp43 inibe, *in vitro*, a fagocitose do fungo pela não ativação dos macrófagos peritoneais de camundongos e a liberação de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Dessa forma, acredita-se que essa glicoproteína é mediadora do mecanismo de escape do fungo, pois facilita o estabelecimento e desencadeamento de infecção primária em hospedeiros susceptíveis.

Barbosa e colaboradores (2005) demonstraram que a proteína GAPDH, expressa pelo *P. brasiliensis*, também é capaz de se ligar aos componentes da matriz extracelular mediando o processo de aderência e internalização do fungo. Além disso, a protease extracelular produzida pelo *P. brasiliensis*, serina-tiol, é mais um provável fator de virulência que pode hidrolizar componentes da membrana basal, como a fibronectina, laminina, colágeno IV e proteoglicanas (CARMONA *et al.*, 1995; PUCCIA *et al.*, 1998; PUCCIA *et al.*, 1999). Esta atividade enzimática, em colaboração com a gp43 e GAPDH, aumenta a capacidade de disseminação do fungo (SOARES *et al.*, 1998).

A infecção por *P. brasiliensis* induz a síntese de leucotrienos, que são importantes mediadores da reação inflamatória aguda induzida pela PCM. Estudos que inibiram os leucotrienos *in vitro* demonstram que a ativação da imunidade inata pode resultar no aumento da ingestão e sobrevivência das leveduras, levando ao desenvolvimento de uma doença mais grave (CALICH *et al.*, 2008).

Por fim, as células de *P. brasiliensis* produzem melanina na presença de L-DOPA (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina) (GÓMEZ *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2006). A melanina é sabidamente um fator de virulência encontrado em diversos patógenos de plantas e animais (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; GÓMEZ & NOSANCHUK, 2003). Os fungos melanizados apresentam certa resistência aos mecanismos de defesa

---

do hospedeiro e a antifúngicos como anfotericina B e azólicos (TABORDA *et al.*, 2008).

### **1.3 Paracoccidioidomicose (PCM)**

#### **1.3.1 Epidemiologia**

A Paracoccidioidomicose é uma micose profunda, de distribuição geográfica restrita aos países latinos - americanos situados entre 23° ao norte e 35° ao sul do Equador; desde o México até a Argentina. Entretanto, essa micose não apresenta distribuição uniforme por todo o continente, restringindo-se apenas a alguns países (RESTREPO, 2001).

Os países com alta endemicidade situam-se em regiões conhecidas como reserváreas, com temperaturas médias entre 10 – 28 °C, umidade relativa alta e pluviosidade anual entre 800 a 2000 mm/ano (LONDERO & MELO, 1988) com inverno curto e verão chuvoso (RESTREPO, 1985a). São áreas com altitude entre 50 e 1700 m, solo geralmente ácido, presença de rios e de florestas tropicais e subtropicais ou de transição para o cerrado (LACAZ *et al.*, 1994a).

Por não ser de notificação compulsória, não é possível estabelecer com exatidão a prevalência e incidência da doença (LACAZ, 1982), sendo estimadas a partir de casuísticas já publicadas e da estatística de hospitais universitários (LACAZ, 1956). A partir desses dados, verifica-se que a micose, na sua forma ativa e progressiva, tem incidência maior no Brasil, Venezuela, Colômbia (RESTREPO, 1985a) e Guatemala (LACAZ, 1982), não havendo relatos de ocorrência na Nicarágua, nas Guianas e no Chile (RESTREPO, 2001).

O Brasil apresenta o maior número de casos já relatados mundialmente (RESTREPO, 1985a), sendo sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais), sul (Paraná, Rio Grande do Sul) e centro-oeste (Goiás e Mato Grosso do Sul) as regiões mais acometidas (WANKE & LONDERO, 1994). A PCM foi responsável por aproximadamente metade do total de mortes causadas por micoses sistêmicas, com São Paulo e Paraná apresentando as maiores taxas de mortalidade (PRADO *et al.*, 2009). Há relatos recentes de casos nos estados do Pará e Rondônia. Os casos de PCM relatados em regiões não endêmicas são referentes aos pacientes que já haviam residido ou visitado áreas endêmicas da micose (GREER & RESTREPO, 1977; AJELLO & POLONELLI, 1985).

---

A PCM é considerada a oitava causa de mortalidade por doença infecciosa predominantemente crônica entre as doenças infecciosas e parasitárias. Inclui maior que a mortalidade por leishmanioses, e a mais alta taxa entre as micoses sistêmicas (COUTINHO, 2002). Dessa forma, a doença representa um importante problema de saúde pública no Brasil.

### 1.3.2 Patogenia da PCM

A infecção humana por *P. brasiliensis* é adquirida pela inalação das conídeas infectantes presentes no meio ambiente. Esses propágulos, devido às suas dimensões pequenas, alcançam os alvéolos pulmonares e transformam-se em células leveduriformes, estabelecendo assim o complexo primário da infecção (MCEWEN *et al.*, 1987).

O foco primário geralmente é assintomático podendo regredir espontaneamente com a destruição do fungo e formação de cicatrizes estéreis; ou regredir parcialmente com persistência de focos quiescentes do fungo. Eventualmente pode ocorrer desenvolvimento da doença ativa e causar lesões pulmonares localizadas ou benignas com subsequente disseminação linfática e/ou hematogênica para outros órgãos e tecidos com estabelecimento de foco de latência após a involução das lesões primárias (BAZAN *et al.*, 1991). Esse quadro assintomático (PCM-infecção) e as várias manifestações clínicas da doença (PCM-doença) são dependentes tanto das condições genéticas, imunológicas, ocupacionais e sócio econômicas em que o hospedeiro se encontra quanto da virulência das amostras de *P. brasiliensis* (TONELLI & FREIRE, 2000).

Clinicamente, a PCM pode se manifestar sob duas formas distintas, a forma juvenil aguda (subaguda) e a forma crônica (adulta).

A forma juvenil aguda ou subaguda representa cerca de 3 a 5% dos casos. A maioria dos doentes são crianças e adolescentes de ambos os sexos, e ocasionalmente pode ocorrer em adultos jovens. Há uma progressão rápida do fungo com o acometimento do sistema reticuloendotelial (linfonodos, baço, fígado e medula óssea) (TONELLI & FREIRE, 2000) conduzindo a um grave comprometimento da imunidade celular, com a diminuição dos linfócitos T e a presença de altos níveis de anticorpos específicos (CALICH *et al.*, 1998).

Já a forma crônica corresponde a mais de 90% dos casos diagnosticados, sendo mais freqüente em adultos do sexo masculino com idade entre 30 e 50 anos (TONELLI & FREIRE, 2000). Geralmente, os casos são provenientes das constantes recidivas do foco pulmonar quiescente por longo período de tempo (BAZAN *et al.*, 1991). Afeta primeiramente os pulmões levando-os a significativa morbidade. Posteriormente, a doença pode permanecer localizada no pulmão (unifocal) ou disseminar para outros órgãos e tecidos (multifocal), formando lesões secundárias nas mucosas, pele, linfonodos e glândulas adrenais (FRANCO, 1987). Quando há tratamento adequado, pode ocorrer melhora clínica satisfatória, mas as lesões normalmente deixam seqüelas, e a remissão é freqüentemente acompanhada por fibrose pulmonar, resultante do processo inflamatório, o qual pode acarretar disfunções diversas, dependendo do órgão afetado (insuficiência pulmonar, adrenal e renal) (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

### **1.3.3 Resposta imunológica**

Tanto a imunidade inata quanto à específica representa um importante papel nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis*, sendo a imunidade mediada por células considerada a principal defesa contra o fungo (CANO *et al.*, 1998; YONETO *et al.*, 1999; SOUTO *et al.*, 2000).

Como abordado anteriormente, a doença apresenta um amplo espectro de manifestações imunológicas e clínicas, que varia desde as formas benignas até as mais graves dependendo tanto de fatores associados ao fungo, como a sua virulência, quanto de fatores relacionados ao hospedeiro, principalmente sua capacidade imunológica e susceptibilidade genética à infecção (PINA *et al.*, 2004).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis* dependem largamente da ativação de células T helper no controle inicial da infecção (YONETO *et al.*, 1999). Os altos títulos de anticorpos, a ativação policlonal de linfócitos B e a resposta imune suprimida estão geralmente associadas a um quadro de doença disseminada, aguda e progressiva, enquanto que a imunidade mediada por células está fortemente envolvida na resistência ao fungo (CANO *et al.*, 1998; CALICH *et al.*, 1998b).

### 1.3.3.1 Imunidade inata

A resposta imunológica inata é fundamental na fase inicial da infecção, pois é ela que determina o tipo de resposta adaptativa que será desencadeada no controle da PCM. As células que participam da resposta imunológica inata podem ser agrupadas em dois tipos principais: aquelas que apresentam atividade fagocítica como os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, sendo também essas duas últimas de grande importância na apresentação de antígenos e células de origem linfóide como as células “natural killer” (NK) e os linfócitos (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997, 2000).

A resposta imune inata contra *P. brasiliensis* é iniciada no pulmão pela secreção de algumas proteínas antimicrobianas a partir do epitélio pulmonar e pela atividade fagocítica de macrófagos alveolares (ROMANI, 2004). A interação inicial entre o macrófago e o patógeno resulta na internalização do fungo pela célula ativada, as quais podem matar e eliminar o microrganismo através da ação de espécies reativas de oxigênio e enzimas líticas ou por contenção extracelular microbiana. Além disso, a secreção de quimiocinas e citocinas regula a expressão de moléculas quimiotáticas e de adesão celular, que controlam o influxo e a ativação de células inflamatórias para o sítio de infecção (ROMANI, 2004).

Os macrófagos, além de produzirem e liberarem mediadores inflamatórios também são eficientes células apresentadoras de antígenos (APC). Participam do processo de fagocitose de partículas e agentes microbianos, e os carregam aos linfonodos, onde as respostas imunes específicas são geradas. Dessa forma, os macrófagos podem estar envolvidos tanto nas respostas imunes inatas quanto nas adquiridas ao *P. brasiliensis*, atuando assim como células efetoras (CANO *et al.*, 1995).

As células NK constituem um importante subgrupo de células de origem linfóide, inicialmente descritas como fundamentais na resistência a tumores e infecções virais. Recentemente, essas células NK têm sido associadas à resistência a outros agentes patogênicos como bactérias e fungos intracelulares, porém sua participação na infecção humana pelo *P. brasiliensis* ainda é pouco conhecida. Os dados disponíveis sugerem que essas células possam desempenhar na paracoccidiodomicose, assim como em outras doenças, um papel importante no início da resposta imunológica ao fungo e, por conseguinte, influenciar o desenvolvimento da resposta imunológica adquirida. Dentre as funções dessas células incluem: a destruição de células infectadas pelo fungo por meio de mecanismos citotóxicos e a inibição do crescimento ou morte direta do

fungo. Além disso, essas células poderiam ser uma fonte importante e precoce de IFN- $\gamma$  (VIVIER *et al.*, 2008; LIEBERMAN & MANDELBOIM, 2000; MAMONI, 2005).

O sistema do complemento pode ser ativado pelo *P. brasiliensis*, o qual desencadeia uma fagocitose mais eficiente pelos macrófagos devido à atuação dos componentes do complemento na opsonização do microrganismo (CALICH *et al.*, 1985). Tanto a via clássica quanto a alternativa são ativadas em resposta ao fungo (SPETH *et al.*, 2004).

### **1.3.3.2 Imunidade adquirida**

#### **1.3.3.2.1 Imunidade celular**

A importância dos linfócitos T em PCM experimental foi demonstrada em estudos utilizando camundongos atímicos, Nude (Nu/Nu), que são desprovidos de timo e, portanto deficientes de imunidade mediada por células T (KERR *et al.*, 1988; BURGER *et al.*, 1996). Segundo Burger e colaboradores (1996), esses animais desenvolveram infecção pulmonar grave e generalizada com intenso parasitismo e apresentaram sobrevida menor do que os normais. Entretanto, os animais conservaram a habilidade de controlar a disseminação fúngica durante as fases iniciais da infecção (CALICH *et al.*, 1998). Esses fatos demonstram a importância dos linfócitos T e da imunidade inata no estabelecimento da imunidade protetora contra a infecção por *P. brasiliensis* (CALICH *et al.*, 1998).

Os linfócitos T podem se diferenciar em linfócito T citotóxico e linfócito T auxiliar (TH1 e TH2). Os linfócitos do tipo TH1 e TH2, apesar de não serem distinguidos fenotipicamente, apresentam diferenças quanto ao tipo de resposta imunológica desencadeada e o padrão e citocinas liberadas (CALICH & KASHINO, 1998). Os linfócitos do tipo TH1 produzem citocinas pró- inflamatórias, como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e estimulam a resposta imune celular, enquanto o tipo TH2 favorece a produção de IL-4, IL-5 e IL-6 e desencadeiam a imunidade humoral (ARRUDA *et al.*, 2004; PINA *et al.*, 2004). Embora na PCM não ocorra um padrão de resposta imune TH1/TH2 totalmente polarizado, a resistência à PCM está, geralmente, associada à ativação progressiva e equilibrada de células T CD4<sup>+</sup> do tipo TH1, enquanto que a susceptibilidade refere-se à ativação precoce e intensa de células CD4<sup>+</sup> do tipo TH2 e CD8<sup>+</sup> (CALICH *et al.*, 1998).

O IFN- $\gamma$  exerce um papel relevante na resistência do hospedeiro a infecção pelo *P. brasiliensis* devido a sua capacidade de ativar macrófagos a eliminar o fungo, evitando com isso a disseminação e progressão da doença (CANO *et al.*, 1998). Além disso, o IFN- $\gamma$  estimula macrófagos a secretarem citocinas, como TNF- $\alpha$ , as quais recrutam polimorfonucleares (PMNs) e leucócitos para o local de invasão do patógeno. A resposta imune inflamatória desencadeada favorece a fagocitose e morte de microrganismos via geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a liberação de enzimas líticas presentes em seus granulomas (CASSATELLA, 1995).

As células TCD8<sup>+</sup> são necessárias para a remoção eficiente de fungos dos tecidos de camundongos infectados com *P. brasiliensis*, pois possuem uma atividade protetora precoce e eficaz na resposta imune desencadeada em animais suscetíveis (CALICH *et al.*, 1998; CANO *et al.*, 2000).

### **1.3.3.2 Imunidade humoral**

Como relatado anteriormente, os altos níveis de anticorpos específicos estão geralmente associados às formas mais graves da doença (CALICH, 1998). Sendo assim, a análise dos títulos de anticorpos em soros de pacientes tem sido realizada para auxiliar no diagnóstico da doença e para avaliar a evolução e resposta imune ao tratamento da PCM (FRANCO, 1986). Após o tratamento, o indivíduo apresenta melhora clínica, diminuição dos títulos de anticorpos e restabelecimento da imunidade celular (RESTREPO-MORENO, 1993; REIS *et al.*, 2005).

Todas as classes de imunoglobulinas podem ser detectadas em pacientes infectados, com predomínio da classe IgG. Há uma ativação policlonal com aumento nos níveis de IgG, IgA e IgE que, provavelmente, atuam na opsonização do agente infeccioso juntamente com os componentes do complemento (CALICH, 1985). Os níveis de IgG e IgE aumentam com a disseminação da doença e gravidade de suas formas clínicas (FRANCO, 1986). Na fase crônica localizada seus níveis apresentam-se baixos. Os níveis de IgA mostraram-se elevados principalmente na fase crônica, provavelmente devido ao envolvimento do trato respiratório e mucosas e os níveis de IgM se mantiveram dentro dos limites normais em todas as fases da PCM (BAIDA *et al.*, 1999).

As respostas de anticorpos aos antígenos protéicos requerem a participação das células T auxiliares, que se diferenciam em subpopulações de células efectoras (TH1 e

TH2) produtoras de diferentes citocinas. As citocinas possuem um importante papel na regulação da resposta imune e na mudança de isotipos das imunoglobulinas (SNAPPER *et al.*, 1997).

O perfil TH1 está relacionado à produção de citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$ , as quais estimulam a troca de isotipos para células B, tais como, IgG2a, IgG2b e IgG3. Enquanto TH2 produz, por exemplo, IL-4, induz a troca para a IgE e outros isotipos como IgG1 (BANCHEREAU & ROUSSET, 1992; SNAPPER *et al.*, 1992).

Assim, o IgG2a exerce um importante papel no estabelecimento da proteção por ser potente agente opsonizador e, em conjunto com o sistema complemento, promovem a destruição e a eliminação das células fúngicas (RESTREPO & MORENO, 1993; CALICH, 1998). Ao contrário, o IgG1 não fixa complemento e não se ligam a receptores de fagócitos Fc $\gamma$  e, portanto, parecem não desencadear uma resposta protetora na PCM (CALICH *et al.*, 1998; CANO *et al.*, 1987; KASHINO *et al.*, 2000). Porém, as citocinas de perfil TH2 (IL-4, IL-5, IL-6 e TGF- $\beta$ ) agem na modulação da resposta celular suprimindo a reação inflamatória exacerbada e inibem a ativação de macrófagos.

### 1.3.3.3 Reação granulomatosa

A resposta tecidual do hospedeiro ao *P. brasiliensis* é caracterizada pela reação de hipersensibilidade do tipo granulomatosa, com participação ativa de células T, atuando no recrutamento, processamento e na ativação dos macrófagos. Evidências diretas e indiretas indicam que o granuloma está intimamente relacionado à resposta imune do hospedeiro, podendo representar uma resposta tecidual imuno específica destinada a conter a multiplicação (FRANCO, 1986) e os efeitos tóxicos de componentes derivados de células leveduriformes sobre células vizinhas (DE BRITO & FRANCO, 1994).

O processo de formação do granuloma inicia-se quando os antígenos do fungo são capturados e processados por células apresentadoras de antígenos que incluem células dendríticas e macrófagos. Posteriormente, os antígenos associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) são apresentados aos linfócitos T-auxiliares (TH) que ao reconhecê-los tornam-se ativados. A ativação leva à expansão clonal, secreção de citocinas e recrutamento de leucócitos adicionais (DE BRITO & FRANCO, 1994). As células recrutadas acumulam-se em torno das

células leveduriformes, dando origem ao granuloma propriamente dito, constituído por células epitelióides e gigantes. A destruição local de tecido é seguida por fibrose, um processo de cicatrização no qual fibroblastos deslocam-se por quimiotaxia para o local da lesão e produzem o colágeno que constituirá a cicatriz (FRANCO, 1986; DE BRITO & FRANCO, 1994).

Os granulomas formados em resposta ao *P. brasiliensis* são constituídos, inicialmente, por macrófagos e polimorfonucleares (PMN), sendo que os primeiros estão localizados na parte central e os últimos em sua periferia. As células gigantes, formadas a partir da fusão de macrófagos, são encontrados no interior dos granulomas. Células viáveis do fungo podem ser observadas no interior das células gigantes ou livres apresentando brotamento simples ou múltiplo (FRANCO, 1989).

É importante salientar que, em pacientes com a doença benigna, a resposta imune induz a formação de granulomas compactos e densos com níveis baixos de células fúngicas enquanto nos pacientes que desenvolvem a doença grave, há geralmente, a formação de granulomas frouxos, associados a grandes quantidades de células fúngicas viáveis (MOSCARDI-BACCHI *et al.*, 1994).

### **1.3.4 Diagnóstico**

O diagnóstico conclusivo da PCM é obtido laboratorialmente através da demonstração e do reconhecimento do agente em preparados histológicos, exame a fresco ou em cultivo. Tais procedimentos são conhecidos como técnicas diretas de diagnóstico (LONDERO & MELO, 1998).

A microscopia direta permite a visualização de células leveduriformes arredondadas, isoladas ou agrupadas, apresentando dupla parede refringente com brotamentos simples ou múltiplos (LACAZ, 1994b). Enquanto que os exames histopatológicos revelam reação granulomatosa, com presença de células inflamatórias e células fúngicas viáveis em resposta ao fungo (BOGLIOLO, 1976).

Nem sempre os procedimentos de observação microscópica e isolamento do fungo são acessíveis. E, apesar da sensibilidade do exame micológico direto variar entre 85 a 100%, o tempo necessário para identificação do microrganismo pode ser longo (BRUMMER *et al.*, 1993). Nesse caso, métodos indiretos auxiliam no diagnóstico de pacientes com sinais ou sintomas clínicos sugestivos da PCM.

A sorologia permite o acompanhamento do paciente durante e após o tratamento, através do exame de amostras seriadas do soro (RESTREPO, 1984; MENDES *et al.*, 1994; MARQUES, 2003). Vários são os testes sorológicos frequentemente utilizados para detecção de anticorpos específicos: imunodifusão dupla (ID), contra-imunoelektroforese (CIE), reação de fixação de complemento (FC), Imunofluorescência indireta (IF), ensaio imunoenzimático (ELISA) e immunoblotting (RESTREPO, 1992). A técnica de escolha utilizada deve aliar sensibilidade à especificidade para que o valor preditivo seja máximo e reproduzível (MARQUES, 2003). Os resultados desses testes, no entanto, devem ser criteriosamente interpretados e correlacionados com os achados clínicos, dados epidemiológicos e outros exames laboratoriais, para um diagnóstico definitivo (MARQUES, 2003).

Em PCM, o principal método de diagnóstico sorológico para identificação de anticorpos anti-*P. brasiliensis* é a imunodifusão dupla em gel de agarose (ID), devido a sua praticidade, sensibilidade e especificidade. O ELISA também é muito utilizado para exame de grande número de soros, por ser uma técnica rápida e sensível. Porém, sua especificidade é menor do que a da ID, exigindo cuidadosa padronização e interpretação dos resultados positivos (PUCCIA, 1986; DINIZ, 2002; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

O uso de testes sorológicos na rotina de diagnóstico da PCM é limitado, devido, principalmente, às dificuldades na obtenção de antígenos purificados do *P. brasiliensis*, a padronização dos testes sorológicos e a reatividade cruzada. Além disso, trata-se de técnicas ainda restrita a poucos serviços de saúde e mais utilizadas na área da pesquisa.

A reação intradérmica com a paracoccidioidina é utilizada para a determinação de áreas endêmicas da PCM, através de inquéritos epidemiológicos, não sendo adequada para diagnosticar a doença (LACAZ, 1956; FAVA NETTO, 1976). Devido à depressão da imunidade celular, a reação pode ser negativa nas formas graves da doença ou pode-se observar positividade do teste em grande número dos casos tratados com sucesso e em pacientes sensíveis à paracoccidioidina (FAVA NETTO *et al.*, 1969). Além disso, indivíduos não portadores da PCM, que residem ou residiram em zonas endêmicas da doença, podem desenvolver reação positiva ao antígeno (LACAZ, 1951).

Os métodos moleculares permitem a identificação do fungo sem a necessidade de cultura. São rápidos, altamente específicos e sensíveis. O fungo *P. brasiliensis* já foi identificado utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com

iniciadores para seqüências específicas codificadoras de proteínas desse fungo (GOLDANI & SUGAR, 1998; GOMES *et al.*, 2000; NAKAGAWA *et al.*, 2002). Porém, ainda são técnicas caras e também restritas aos centros de pesquisa.

Outros exames complementares como hemograma, dosagem de proteína C reativa e exame de imagens são utilizados com frequência para diagnóstico da extensão do acometimento da micose.

### **1.3.5 Tratamento**

#### **1.3.5.1 Tratamento das infecções fúngicas**

As atuais linhas de tratamento disponíveis para as infecções fúngicas apresentam, no geral, limitações devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência e baixa efetividade causada pelas drogas fungistáticas, como os azóis (itraconazol, fluconazol e cetoconazol), ou pelos sérios efeitos colaterais causados por drogas mais potentes como os polienos (Anfotericina B) (CARRILLO MUNÓZ *et al.*, 2006).

O principal alvo de ação dos azóis é a enzima 14 $\alpha$ -desmetilase, que participa da síntese do ergosterol, principal esteroide fúngico. A diminuição do ergosterol resulta na alteração da permeabilidade e fluidez da membrana fúngica (ODDS *et al.*, 2003). Entre as maneiras conhecidas pelas quais os fungos ficam resistentes a esses antifúngicos, destacam-se: a) alteração da estrutura da enzima-alvo (14 $\alpha$ -desmetilase), tornando o tratamento ineficaz; b) maior produção da enzima alvo pelo fungo, sendo necessário o emprego de maior quantidade da droga; (c) desenvolvimento de mecanismos de bomba de efluxo através do qual a droga é expulsa do meio intracelular; (d) impermeabilização da membrana fúngica à droga; (e) secreção de enzimas capazes de degradar a droga no meio extracelular (GHANNOUM & RICE, 1999; SMITH & EDLIND, 2002).

Os polienos (Anfotericina B), embora apresentem amplo espectro fúngico, potente atividade fungicida e raros episódios de resistência, causam sérios efeitos toxicológicos ao paciente. Esses efeitos podem ser classificados em agudos (febre, vômito e dores de cabeça) ou subagudos (insuficiência renal) (LEMKE *et al.*, 2005). O seu mecanismo de ação ocorre pela ligação direta com o ergosterol da membrana fúngica, levando à quebra da integridade osmótica da membrana (CARRILLO MUNÓZ *et al.*, 2006).

A PCM é a única micose tratada por sulfonamidas. Essas drogas, que inibem competitivamente a enzima catalisadora da reação de síntese do ácido fólico, necessário à síntese de ácidos nucleicos, foram introduzidas no tratamento da micose em 1940 (RIBEIRO, 1940) e ainda são utilizadas devido a algumas de suas vantagens, tais como: facilidade para administração oral, baixo custo e baixos níveis de toxicidade. Porém, o período requerido para o tratamento é longo (acima de 2 anos) e a taxa de recidiva é significativa (25%) (RESTREPO-MORENO, 1993).

### **1.3.5.1 Esquema terapêutico na PCM**

A eficácia do tratamento da PCM depende não somente da droga anti-fúngica escolhida, mas também da implementação de medidas que melhorem as condições gerais do paciente e do acompanhamento pós terapêutico prolongado, para evitar recidivas da doença (VERONESI, 1997; TONELLI & FREIRE, 2000).

O paciente, antes de iniciar a terapêutica anti-fúngica específica, necessita de medidas para o melhoramento do seu quadro nutricional e da imunodepressão celular associada à infecção pelo *P. brasiliensis*. Hábitos sociais como tabagismo, etilismo e insuficiência adrenal são comumente observados entre os pacientes e, frequentemente, contribuem para a imunossupressão. Além disso, devem-se diagnosticar e tratar infecções concorrentes como enteroparasitoses e co-infecções bacterianas (MARQUES, 2003; TELLES, 2005).

A escolha da melhor opção terapêutica tem que levar em consideração não apenas a eficácia e segurança da droga anti-fúngica, mas também o acesso do paciente ao medicamento durante todo o tratamento. Uma vez que a maioria dos indivíduos acometidos por essa micose apresenta condição sócio econômica precária e, portanto, são incapazes de custear o tratamento prolongado. Dessa forma, a medicação prescrita deve ser preferencialmente fornecida gratuitamente pelo sistema de saúde público (VERONESI, 1997).

O tratamento é prolongado e apesar de não haver um consenso quanto a um esquema terapêutico devem-se considerar os critérios de cura (clínico, micológico, radiológico e imunológico) e acompanhamento periódico após a interrupção do tratamento para reduzir as chances de recidivas da doença (DEL NEGRO, 1974). A suspensão precoce do tratamento pode causar altos índices de reativação da infecção e,

---

em pacientes susceptíveis a doença é geralmente fatal (MENDES *et al.*, 1994; REIS & COLOMBO, 1999).

Atualmente, o tratamento da PCM é realizado utilizando-se antifúngicos como sulfonamidas, polienos (anfotericina B) e os imidazólicos (itraconazol, fluconazol e cetoconazol).

Os azoles são eficazes no tratamento das formas leves e moderadas da doença, pois apresentam poucos efeitos colaterais e o tempo de tratamento é relativamente curto quando comparado ao dos sulfonamídicos e antibióticos poliênicos (Anfotericina B) (LACAZ & SAMPAIO, 1958; RESTREPO *et al.*, 1990; HAHN *et al.*, 2003). Porém, os sulfonamídicos são ainda os antifúngicos de escolha nos hospitais públicos da maioria dos Estados do Brasil (VISBAL *et al.*, 2005; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006) por serem de baixo custo e acessível a população, bem como, pela facilidade de sua administração oral e os baixos níveis de toxicidade apresentados. Apesar disso, o tratamento com esse antifúngico é prolongado, sendo comum o paciente descontinuar o tratamento antes do período adequado aumentando, com isso, as chances de recidiva do fungo e o estabelecimento da fase crônica da doença (MENDES *et al.*, 1994; REIS & COLOMBO, 1999; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Pacientes com formas graves, necessitando internação hospitalar, devem receber anfotericina B ou associação sulfametoxazol/ trimetoprima por via intravenosa. Porém, seus efeitos colaterais, administração intravenosa (tratamento hospitalar) e o alto custo, principalmente das formulações lipossolúveis, dificultam a sua utilização (RESTREPO-MORENO, 1993).

Apesar dos quimioterápicos serem à base do tratamento da PCM em suas várias formas, problemas relacionados ao longo período de medicação (particularmente os sulfonamídicos), aos efeitos nefrotóxicos da anfotericina B associados a outros efeitos indesejáveis, a resistência dos microrganismos aos anti-fúngicos e aos altos custos destes medicamentos (azoles e formulação lipídica da anfotericina B) têm estimulado a busca de estratégias profiláticas e/ou terapêuticas eficazes para o controle da PCM.

### **1.3.6 Imunógenos protetores em PCM**

O fungo *P. brasiliensis* sintetiza um complexo de substâncias antigênicas (polissacarídeos, peptídeos e lipídeos) que interagem com o sistema imune do hospedeiro. Vários desses componentes estão localizados na parede do fungo (antígenos

---

de superfície), enquanto outros são sintetizados e liberados pelo fungo no meio (exoantígenos). Há ainda os antígenos somáticos ou celulares que são obtidos do extrato total das células do microrganismo (FRANCO, 1986; DINIZ *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2005).

Os antígenos extracelulares fazem o primeiro contato com as células do hospedeiro e, portanto, desempenham um papel fundamental no processo infeccioso da PCM. Os exoantígenos podem promover efeitos estimulatórios ou supressores, dependendo da interação com as células hospedeiras ou de como são processados pelas células apresentadoras de antígenos (FRANCO *et al.*, 1993). Os antígenos somáticos têm sido estudados em busca de melhorar não só o conhecimento químico dessas moléculas, mas também caracterizar a reatividade imunológica induzida por eles em pacientes com PCM.

Existem algumas publicações descrevendo a importância dos antígenos do fungo na modulação da resposta imune. O principal componente antigênico de *P. brasiliensis*, uma glicoproteína de 43 kDa (gp43), apresentou eficácia como antígeno protetor em PCM experimental. Camundongos saudáveis, sensíveis ao fungo, quando imunizados com a gp43, produziram níveis substanciais de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-10, refletindo em um bom equilíbrio na secreção de citocinas com conseqüente estabelecimento de uma resposta imune efetiva. Ao contrário, os animais que desenvolveram PCM apresentaram baixos níveis de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , porém quantidades substanciais de IL-10. Esse desequilíbrio na produção de citocinas parece comprometer a resposta imune do hospedeiro com a diminuição da atividade microbicida e habilidade da apresentação do antígeno pelos macrófagos (BAVA *et al.*, 1991; DEEPE, 2004). Além disso, imunizações com um peptídeo de 15 aminoácidos identificado na molécula gp43 (P10) induziram proteção vigorosa contra subsequente desafio intratraqueal por leveduras virulentas de *P. brasiliensis*, com grande diminuição da carga fúngica do pulmão e menor ou nenhuma disseminação para o baço e fígado, quando comparado com os animais controle (TABORDA *et al.*, 1998; TABORDA *et al.*, 2004). Uma vacina de DNA contra a paracoccidiodomicose em murinos, construída a partir do gene da gp43, também foi protetora contra desafios intratraqueais com a levedura virulenta (PINTO *et al.*, 2000). Outras formulações de vacina anti-PCM baseadas na gp43 e no peptídeo P10 também tem se mostrado eficazes na proteção do hospedeiro ao fungo, incluindo ensaios profiláticos e terapêuticos em animais suscetíveis (MARQUES *et al.*, 2006) e

---

anérgicos (MARQUES *et al.*, 2008) imunizados e/ou tratados com a P10 associada ou não a drogas antifúngicas. Além disso, o peptídeo P10 foi estudado em associação com uma proteína imunorreguladora ligante de TLR-5, Salmonela entérica FliC Flagellin. Camundongos BALB/c imunizados com a gp43 associada à FliC e desafiados com o *P. brasiliensis* virulento apresentaram aumento na proliferação fúngica e nos danos do tecido pulmonar. Ao contrário, quando a FliC foi associada a P10 houve indução de resposta TH1, com conseqüente diminuição da carga fúngica e dos danos pulmonares (BRAGA *et al.*, 2009). Em adição, a resposta imunológica contra a PCM sistêmica em camundongos foi reforçada a partir da incorporação do P10 em nanopartículas PLGA (AMARAL *et al.*, 2010). Por fim, foi demonstrado o potencial da P10 associada às células dendríticas como uma vacina capaz de proteger contra o desenvolvimento da PCM ou diminuir o comprometimento no caso de uma PCM já instalada (MAGALHÃES *et al.*, 2011).

Em adição, antígenos solúveis de *P. brasiliensis* (PbAg) e as frações obtidas por cromatografia de troca iônica de extrato de *P. brasiliensis* (F0, FII e FIII), apresentaram variações na indução da resposta celular. Camundongos imunizados com a F0 e FII desenvolveram PCM benigna crônica restrita ao pulmão, associada a baixas taxas de mortalidade e presença de granulomas compactos com poucas células fúngicas. Os animais imunizados com a F0 apresentaram significativa produção de IFN- $\gamma$  e altos níveis dos isotipos IgG2a e IgG3. As imunizações com FII induziram produção significativa de IFN- $\gamma$  e IL-10 associada aos altos níveis de IgG1 e IgG2a. Tanto F0 quanto a FII promoveram uma diminuição significativa das unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas do pulmão, após a infecção desafio, sem disseminação para o baço e o fígado. Por outro lado, os camundongos imunizados com a FIII desenvolveram uma doença disseminada e progressiva no baço e fígado resultando em alta produção de IgG1 e IgG2a, e baixa produção de IgG2b e IgG3 após o desafio. Esses animais não foram capazes de controlar a infecção desafio apresentando disseminação do fungo, altos níveis de anticorpos específicos e lesões granulomatosas com alto número de células fúngicas viáveis (DINIZ *et al.*, 2004).

Estudos recentes também demonstraram o potencial do uso da proteína recombinante de 27 kDa (rPb27), presente na fração F0 descrita anteriormente, em ensaio de imunodiagnóstico para PCM e em testes para avaliar a sua capacidade protetora em modelo animal (ORTIZ *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 2008). Segundo Reis e

colaboradores (2008), a rPb27 foi capaz de proteger eficientemente camundongos BALB/c infectados com a forma leveduriforme altamente virulenta de *P. brasiliensis*. Em seguida, o efeito protetor das proteínas recombinantes rPb40 e/ou rPb27 utilizadas em associação ao fluconazol na vacinação terapêutica contra PCM foi demonstrado por Fernandes e colaboradores (2011 e 2012). A imunização foi capaz de diminuir a carga fúngica pulmonar e evitar a sua disseminação aos outros órgãos e tecidos.

Outras proteínas que apresentaram certo grau de proteção na vacinação profilática e terapêutica em PCM experimental foram as proteínas de choque térmico (HSP) (RIBEIRO *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007).

Por fim, células leveduriformes de *P. brasiliensis* (amostra Pb18) atenuadas por radiação gama (LevRad) foram capazes de conferir proteção potente contra desafio subsequente utilizando o fungo viável altamente virulento (MARTINS *et al.*, 2007, MARTINS, *et al.*, 2009).

Vacinas vivas, obtidas a partir de patógenos atenuados, têm sido utilizadas com sucesso na prevenção de muitas doenças de importância médica. A grande vantagem atribuída a esse tipo de imunização é devida à capacidade dos microrganismos atenuados de apresentarem seus antígenos sequencialmente ao hospedeiro e poderem até mesmo sintetizar antígenos que só são produzidos durante a infecção. Esses mimetizam a infecção natural sendo capazes de desencadear uma resposta imune protetora duradoura, devido ao estabelecimento de uma memória imunológica, mas sem o risco uma infecção progressiva (HIRAMOTO *et al.*, 2002).

Um exemplo bem sucedido e bastante conhecido é a vacina BCG, utilizada na prevenção da tuberculose. O microrganismo *Mycobacterium bovis*, foi atenuado acidentalmente após o cultivo da bactéria, *in vitro*, por um período prolongado de 13 anos. Após sucessivas passagens da amostra em cultura, foi observada perda gradual da virulência e alterações da sua morfologia sem alteração da sua imunogenicidade. A BCG tem sido utilizada com êxito sem registros de grandes complicações (ANDRADE *et al.*, 2005). A vacina tríplice viral, constituída de vírus vivos atenuados, contra sarampo, caxumba e rubéola, também tem se mostrado eficaz desde seu licenciamento no início da década de 70. Os eventos imediatos de hipersensibilidade após a administração da vacina viva são extremamente raros, sendo contra-indicada apenas em pessoas com história de reação anafilática após ingestão de ovo ou da neomicina contida na formulação da vacina (ANDRADE *et al.*, 2005).

---

Além disso, vacinas vivas têm sido testadas com sucesso em modelos murinos contra algumas espécies fúngicas. Camundongos imunizados com as leveduras atenuadas de *Blastomyces dermatidis*, deficiente no gene “Blastomyces adhesion I” (BAD1), sobreviveram ao desafio com formas altamente virulenta do fungo e houve evidências de imunidade esterilizante (WUTHRICH *et al.*, 2000). Essa vacina viva atenuada foi testada em cães e tem demonstrado bons resultados quanto a sua segurança, tolerância e imunogenicidade (WUTHRICH *et al.*, 2011). Um mutante geneticamente modificado de *Coccidioides posadasii*, no qual a enzima quitina sintetase foi deletada, desencadeou uma resposta imune eficaz em camundongos vacinados e, posteriormente desafiados intratraquealmente com artroconídeos de uma amostra selvagem virulenta (OKEKE *et al.*, 2003). Um mutante avirulento de *C. immitis* também foi capaz de desencadear resposta imune protetora (OKEKE *et al.*, 2003). Outro importante exemplo é a vacina viva atenuada desenvolvida para prevenção da dermatofitose causado pelo *Trichophyton verrucosum* (GUDDING *et al.*, 1986), a qual permitiu o controle da doença. Proteção também tem sido induzida por amostras fúngicas naturais que exibem perda de patogenicidade, como a amostra de *Candida albicans* que perdeu a sua habilidade de filamentar (CENCI *et al.*, 1989). Especialmente para *P. brasiliensis*, a imunização com isolados de baixa virulência (Pb265) foi capaz de induzir proteção em camundongos suscetíveis (ARRUDA *et al.*, 2007).

Vacinas utilizando microrganismos vivos atenuados por radiação ionizante têm sido estudadas desde 1950 (WALLES & KUSEL, 1992). Porém, a utilização de fungos radioatenuados está sendo explorada pela primeira vez para este propósito.

As irradiações com raios gama e raios X se apresentaram de forma consistente como bons agentes de atenuação para uma variedade de patógenos. Os microrganismos radioatenuados, freqüentemente, perdem a sua capacidade patogênica, mantendo seus aspectos morfológicos, e estimulam uma resposta imune específica. Em alguns casos os patógenos atenuados por radiação ionizante, por razões ainda não esclarecidas, são mais imunogênicos que os controles não irradiados (WALLES & KUSEL, 1992).

Vacinas radioatenuadas contra o *Dictyocaulus viviparus*, causador da bronquite parasitária em bovinos, tem sido utilizada com êxito desde 1958 (TAYLOR *et al.*, 1986). Em adição, larvas irradiadas utilizadas no controle da bronquite parasitária provocada por *Dictyocaulus filaria* em carneiros e cabras (SHARMA *et al.*, 1988), e na

---

imunização de cães contra *Ancylostoma caninum* (VINAYAK *et al.*, 1981) têm sido empregadas em escala comercial.

Imunizações efetivas em animais de laboratório têm sido alcançadas utilizando vários protozoários irradiados, incluindo espécies de *Plasmodium* (HERRINGTON *et al.*, 1990; CLYDE, 1990), *Leishmania* (YANG *et al.*, 1991; RIVIER *et al.*, 1993; BONETTI *et al.*, 1993), *Trypanosoma* (VOS & GARDINER, 1990) e *Toxoplasma gondii* (DUQUESNE *et al.*, 1991). Estudos em modelos animais utilizando cercárias radioatenuadas de *Schistosoma mansoni* também conferiram alto grau de proteção, contra a esquistossomose (COULSON, 1997). Em adição, Hiramoto e colaboradores (2002) imunizaram camundongos com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* atenuados por irradiação. Após a infecção desafio com os cistos do parasita, houve um aumento da sobrevivência dos animais imunizados. Os taquizoítos irradiados perderam sua capacidade de reprodução, mas mantiveram o seu metabolismo respiratório, a capacidade de invadir células e de sintetizar proteínas.

Além dos exemplos citados acima, resultados satisfatórios foram obtidos nos estudos com muitos helmintos e nematódeos, incluindo *Onchocerca volvulus* (PRINCE *et al.*, 1992), *Brugia malayi* (YATES & HIGASHI, 1986), *Brugia pahangi* (CHUSATTAYANOND & DENHAM, 1986), *Toxocara canis* (ABO-SHEHADA *et al.*, 1991), *Nippostrongylus brasiliensis* (WEDRYCHOWICZ *et al.*, 1984), *Trichinella spiralis* (AGYEI-FREMPONG & Catty, 1983) e *Ascaris suum* (Urban & Tromba, 1982) e várias espécies de *Schistosoma* (Dean, 1983).

Em humanos, uma vacina obtida a partir de esporozoítos irradiados de *Plasmodium falciparum* foi testada em voluntários. Essa foi capaz de estimular uma resposta imune protetora contra a malária (HOFFMAN *et al.*, 2002).

**II. JUSTIFICATIVA**

Doenças causadas por bactérias, vírus, fungos e outros parasitas são as principais causas de morte, incapacitações e instabilidade socioeconômica entre milhões de pessoas. As doenças infecciosas são responsáveis por quase a metade das mortes dentre todas as outras causas de morte ocorridas nos países em desenvolvimento (CASALI *et al.*, 2001).

Provavelmente, o maior avanço na área da medicina, durante o século 20, foi a redução das mortes por doenças infecciosas devido aos maiores incentivos e investimentos em saneamento básico e educação, ao desenvolvimento de vacinas e à introdução de novos antibióticos. Porém, infelizmente, nas duas últimas décadas, assistimos não só ao surgimento de novos patógenos, mas também a reemergência dos antigos que se tornaram resistentes aos tratamentos antimicrobianos amplamente utilizados (CASADEVALL & PERFECT, 2006). Há, portanto, a necessidade preeminente de novas vacinas e medicamentos para prevenir e tratar as doenças infecciosas.

É com esse pensamento que, com o conhecimento em Micologia e Imunologia das doenças infecciosas, nosso grupo tem estudado e trabalhado no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas e profiláticas contra as doenças fúngicas, como, por exemplo, a Esporotricose, Candidíase, Criptococose, algumas Dermatofitoses e, especialmente a Paracoccidioidomicose (PCM).

A PCM, doença fúngica causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, é de grande importância para a saúde no Brasil devido aos altos níveis de morbidade e mortalidade que afetam, principalmente, os indivíduos na sua fase mais produtiva e, ao caráter endêmico que essa doença assume nas regiões do Sul e Sudeste do país. Dependendo da gravidade da doença e do fármaco de escolha, o tratamento pode ser prolongado (6 meses a 2 anos), sendo comum o paciente descontinuar o seu uso, aumentando com isso as chances de recidivas dos focos quiescentes. Além disso, há problemas relacionados a toxicidade medicamentosa (Anfotericina B) e relatos de resistência fúngica, mais particularmente, aos azóis (VISBAL *et al.*, 2005; HAHN *et al.*, 2003; CUTLER *et al.*, 2007; CASSONE, 2008; DAN, 2006).

Até o momento não há vacina efetiva contra a PCM, nem para qualquer outra micose de importância médica. Apenas uma vacina profilática baseada em esférulas de *Coccidioides immitis* inativadas por formalina foi testada em humanos, mas esta não conferiu proteção em uma triagem randomizada (PAPPAGIANIS, 1993; COLE *et al.*,

2004). Vários estudos utilizando animais de laboratório imunizados com patógenos atenuados, como protozoários, helmintos e nematódeos, têm sido efetivamente realizados com o intuito de se pesquisar novas alternativas profiláticas e terapêuticas. Porém, a utilização de fungos atenuados por radiação gama tem sido explorado pela primeira vez para esse propósito.

O potencial da irradiação com uma ferramenta para se obter vacinas vivas eficazes é conhecido desde a década de 50. Patógenos irradiados, geralmente, perdem a sua capacidade de causar infecção, mas mantém a sua atividade metabólica e morfologia. Como em uma infecção natural, microrganismos vivos atenuados são capazes de expor seus antígenos sequencialmente ao hospedeiro, permitindo que o sistema imune os reconheçam como agentes viáveis capazes de desencadear resposta imunológica protetora, sem o risco de uma infecção progressiva. Considerando essa abordagem, a utilização de *P. brasiliensis* atenuado por radiação gama (LevRad), alvo de estudo deste trabalho, representa uma alternativa promissora de vacinação profilática e, principalmente, terapêutica contra a PCM, capaz de driblar a complexidade dos sistemas eucarióticos e, especificamente, o alto grau de variabilidade entre as amostras de *Paracoccidioides*

**III. OBJETIVOS**

### 3.1 OBJETIVO GERAL

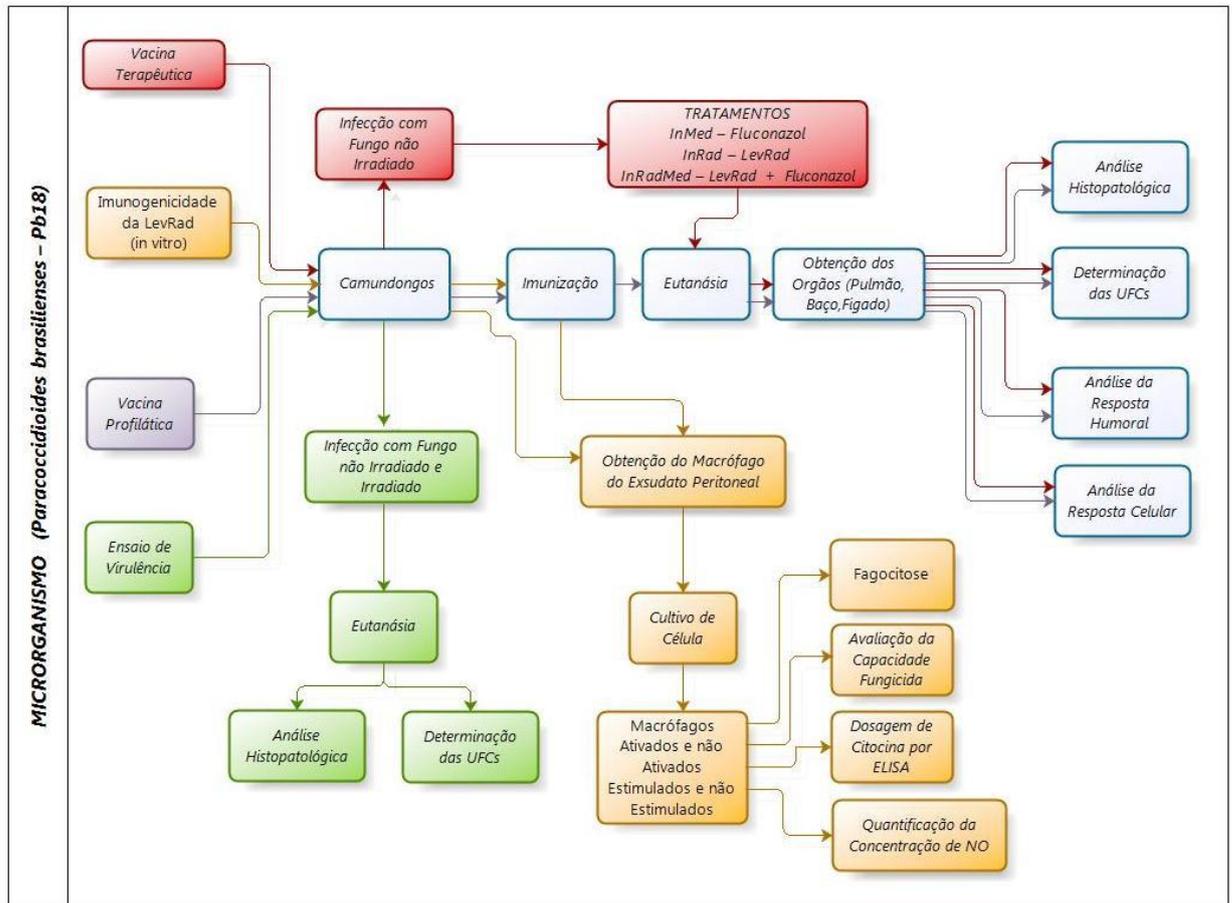
Avaliar o potencial imunogênico das leveduras de *P. brasiliensis* atenuadas por radiação gama (LevRad) na vacinação profilática e terapêutica em modelo animal.

#### 3.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a perda da capacidade infecciosa da LevRad em camundongos Nude e camundongos BALB/c normais ou imunodeprimidos por irradiação gama;
- Avaliar *in vitro* a capacidade imunogênica da LevRad em macrófagos peritoneais;
- Avaliar o potencial profilático da LevRad em animais desafiados, via intratraqueal, com o *P. brasiliensis* virulento não irradiado, amostra Pb18;
- Avaliar a influência da via e do número imunizações na resposta imunológica induzida pela LevRad em PCM experimental;
- Avaliar o potencial terapêutico da LevRad em animais infectados com o *P. brasiliensis* virulento (Pb18) e, posteriormente, imunizados com a LevRad associada ou não ao fluconazol;
- Avaliar a resposta imune humoral e celular desencadeada pela LevRad em PCM experimental.

**IV. MATERIAIS E MÉTODOS**

FLUXOGRAMA DA TESE



Fonte: Elaborado pela autora, 2012.

### 4.1 Camundongos

Camundongos machos suscetíveis BALB/c, com 5 a 8 semanas de idade, foram adquiridos do centro de bioterismo do ICB/UFMG. Parte dos camundongos BALB/c foram imunodeprimidos no laboratório de irradiação gama do CDTN/CNEN, a uma dose de 2,5 kGy (BALB/c\*). Os animais foram considerados imunodeprimidos 24h após a irradiação. Camundongos atímicos (Nude), também com 5 a 8 semanas de idade, foram gentilmente cedidos pela professora Dra. Leda Quercia Vieira do departamento de bioquímica e imunologia - ICB/UFMG. Todos os animais foram mantidos sob condições livres de patógenos específicos e, quando necessário, foram utilizadas gaiolas isoladoras estéreis.

Os protocolos, utilizados neste trabalho para os experimentos realizados com animais, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), número do protocolo 132/2006 (anexo 1).

### 4.2 Microrganismo

O fungo *P. brasiliensis* (amostra Pb18), utilizada na infecção dos camundongos foi mantida em meio de cultura YPD (extrato de levedura 0,5%, peptona 0,5% e dextrose 1,5%) ágar 1,5%, à temperatura de 35°C, com repiques semanais.

A cultura de *P. brasiliensis* (Pb18), crescida em meio sólido, foi radioatenuada no laboratório de irradiação gama do CDTN/CNEN, em fonte uniforme de  $^{60}\text{Co}$ , na presença de oxigênio e a temperatura ambiente. A dose utilizada para atenuação do microrganismo foi de 6,5 kGy a uma taxa de dose de 1000 Gy/h, conforme estabelecido previamente por Demichelli e colaboradores (2006).

### 4.3 Avaliação da viabilidade celular

As células leveduriformes de *P. brasiliensis*, cultivadas como descrito acima, foram homogeneizadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) estéril, pH 7,2. A viabilidade celular foi determinada pelo método modificado de coloração com verde janus (Sigma). A suspensão de células foi incubada com o corante verde Janus 0,05% (1:1, v/v) por 6-8 minutos. Em seguida, a proporção de células viáveis foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Por este método as células viáveis permanecem descoradas e as células mortas se coram em verde. Apenas as preparações fúngicas com viabilidade superior a 80% foram utilizadas como inóculos. A

concentração celular foi ajustada antes da inoculação de acordo com cada propósito experimental.

#### **4.4 Recuperação da virulência de *P. brasiliensis***

Camundongos machos BALB/c foram infectados pelo plexo orbital com  $10^7$  células viáveis de *P. brasiliensis* em um volume final de 50  $\mu$ L de PBS 1x estéril, pH 7,2. Após 30 dias de infecção, os animais foram submetidos à eutanásia e seus pulmões removidos e homogeneizados em 1 mL PBS 1x estéril, pH 7,2. Em seguida, 300  $\mu$ L do macerado foram semeados em meio BHI (infuso cérebro-coração) – ágar 1,5% suplementado com soro fetal bovino 4%, sobrenadante de cultura 5% (obtido a partir da amostra Pb18 de *P. brasiliensis*) e gentamicina 1  $\mu$ L/mL. A virulência do fungo foi recuperada em camundongos BALB/c após duas infecções sucessivas, com intervalo de 30 dias cada.

#### **4.5 Avaliação da perda da capacidade infecciosa da LevRad**

Os camundongos machos imunocompetentes (BALB/c) e imunodeprimidos (BALB/c\* e Nude) foram anestesiados intramuscularmente (i.m) com uma solução contendo xilazina 43% (Dopaser solução injetável, Laboratório Calier do Brasil LTDA, SP) e quetamina 57% (Dopalen injetável, Vetbrands, SP), da qual foi aplicado 40  $\mu$ L/animal. Em seguida, os animais foram infectados pela via endovenosa ou intratraqueal com  $3 \times 10^5$  células viáveis/animal de células leveduriformes viáveis de *P. brasiliensis* virulento não irradiado (Pb18) ou irradiado (LevRad), ressuspendidos em PBS 1x estéril, pH 7,2. Animais não infectados foram considerados o controle negativo do experimento.

A perda da capacidade infecciosa do *P. brasiliensis* foi avaliada 30 e 90 dias após a infecção, a partir da determinação das unidades formadoras de colônias (UFC) e análise histopatológica dos órgãos dos camundongos.

Os camundongos (BALB/c, BALB/c\* e Nude) foram divididos em três grupos experimentais como descrito no quadro 1. O resumo do esquema experimental encontra-se descrito na tabela 1.

Quadro 1: Grupos de animais imunocompetentes e imunodeprimidos utilizados na avaliação da perda da infectividade da LevRad

<b>Camundongos Imunocompetentes (BALB/c)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grupo controle negativo (C-) composto por 10 camundongos BALB/c que não sofreram qualquer tipo de intervenção.</li> <li>• Grupo controle positivo (C+) composto por 10 camundongos BALB/c infectados, via endovenosa ou intratraqueal, com Pb18 não irradiado.</li> <li>• Grupo LevRad composto por 10 camundongos BALB/c infectados, via endovenosa ou intratraqueal, com a LevRad.</li> </ul>
<b>Camundongos Imunodeprimidos (BALB/c*)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grupo controle negativo (C-) composto por 10 camundongos BALB/c* que não sofreram qualquer tipo de intervenção.</li> <li>• Grupo controle positivo (C+) composto por 10 camundongos BALB/c* infectados, via endovenosa ou Intratraqueal, com Pb18 não irradiado.</li> <li>• Grupo LevRad composto por 10 camundongos BALB/c* infectados, via endovenosa ou Intratraqueal, com a LevRad.</li> </ul>
<b>Camundongos Imunodeprimidos (Nude)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grupo controle negativo (C-) composto por 3 camundongos Nude que não sofreram qualquer tipo de intervenção.</li> <li>• Grupo controle positivo (C+) composto por 3 camundongos Nude infectados, via intratraqueal, com Pb18 não irradiado.</li> <li>• Grupo LevRad composto por 3 camundongos Nude infectados, via intratraqueal, com a LevRad.</li> </ul>

Fonte: Elaborada pela autora, 2012

Tabela 1: Esquema experimental para a avaliação da perda da infectividade da LevRad

GRUPOS	INFECCÃO				EUTANÁSIA
	INTRATRAQUEAL		ENDOVENOSA		
	Pb18 não irradiado	LevRad	Pb18 não irradiado	LevRad	
BALB/c - C-	-	-	-	-	30 e 90 dias
BALB/c - C+	+	-	+	-	30 e 90 dias
BALB/c LevRad	-	+	-	+	30 e 90 dias
BALB/c*- C-	-	-	-	-	30 dias
BALB/c*- C+	+	-	+	-	30 dias
BALB/c* LevRad	-	+	-	+	30 dias
Nude - C-	-	-	-	-	30 dias
Nude - C+	+	-	-	-	30 dias
Nude - LevRad	-	+	-	-	30 dias

Fonte: Elaborada pela autora, 2012.

#### 4.6 Avaliação *in vitro* da capacidade imunogênica da LevRad em macrófagos peritoneais

A atividade de macrófagos obtidos do exsudato peritoneal dos camundongos dos camundongos machos BALB/c que não sofreram qualquer intervenção (C-) foi avaliada a partir de ensaios para determinar o índice fagocítica, a capacidade fungicida, a concentração de NO e os níveis de citocinas produzidos frente às células leveduriformes de *P. brasiliensis* irradiadas (LevRad) e não irradiadas (Pb18). A atividade fungicida também foi avaliada em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c imunizados (LevRad) e dos infectados com o fungo não irradiado (C+) estimulados com as células leveduriformes de *P. brasiliensis* não irradiadas (Pb18). Macrófagos peritoneais pré-ativados ou não com o IFN- $\gamma$  murino recombinante (R&D Systems), cultivados em meio RPMI-C, na ausência de estímulo, foram utilizados como o controle de cultura.

##### 4.6.1 Isolamento e cultivo de macrófagos do exsudato peritoneal

Macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c dos grupos C-, C+ e LevRad foram obtidos quatro dias após a injeção intraperitoneal de 1,5 mL de solução de tioglicolato 3%. O pool de células dos animais de cada grupo foi coletado após lavagem peritoneal com aproximadamente 10 mL de meio RPMI-1640 incompleto (RPMI-I) gelado e acondicionadas em tubos de plásticos de 50 mL. Em seguida, as células em RPMI-I foram submetidas a dois ciclos de centrifugação por 10 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspensionado em 1ml de meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino 10%, HEPES 3,6g/L, aminoácidos não essenciais 11 $\mu$ L/mL, piruvato de sódio 110 $\mu$ L/mL, penicilina G sódica 100U/mL e sulfato de estreptomicina 110 $\mu$ g/mL (RPMI-C). A contagem do número total de células e a sua viabilidade foram realizadas empregando o corante azul de trypan em câmara de Neubauer. A suspensão de células foi ajustada à concentração de  $3 \times 10^5$  células/poço e depositadas sobre lamínulas circulares de 13 mm (Glasscyto) estéreis presentes no fundo dos poços das placas de 24 poços (Nunc). As placas foram incubadas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> 5%. Após 2h de incubação, as células não aderidas foram removidas por lavagens sucessivas. Os macrófagos que permaneceram aderidos foram pré ativados com 100 U/mL de IFN- $\gamma$  murino recombinante (R&D Systems) e incubadas por um período de 18h a 37 °C, em estufa de CO<sub>2</sub> 5%.

#### 4.6.2 Infecção *ex vivo* da cultura de macrófagos murinos

As células fúngicas de Pb18 não irradiado e LevRad foram ressuspensas e homogeneizadas em PBS 1x estéril, pH 7,2. A viabilidade celular foi determinada a partir do corante Verde Janus, como descrito no item 4.3 e a suspensão de células fúngicas ajustada à  $6 \times 10^4$  células/poço (razão de uma levedura para cada cinco macrófagos) foi utilizada para o estímulo dos macrófagos obtidos dos grupos C-, C+ e LevRad, previamente ativados com o IFN- $\gamma$  murino recombinante (R&D Systems).

#### 4.6.3 Avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais

A cultura de macrófagos obtidas do grupo C- foi pre-ativada com o IFN- $\gamma$  murino recombinante e, posteriormente, estimulada ou não com as células fúngicas de Pb18 e LevRad. Após o estímulo *in vitro* as células foram cultivadas em triplicata durante 6, 24, 48 e 72 h em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C. A cultura de macrófagos peritoneais e o inóculo das células fúngicas de Pb18 e LevRad, cultivadas somente em meio RPMI-C, foi utilizada como controle do experimento. Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado e estocado no freezer -20 °C para posterior avaliação dos níveis de NO e dosagem de citocinas em resposta aos antígenos.

As lamínulas contendo os macrófagos aderidos foram lavadas com PBS 1X estéril, fixadas com metanol absoluto gelado e coradas com coloração de Panótico (Laborclin). Foram contadas, ao microscópio óptico, 200 células em cada lâmina, com ou sem fagocitose, e também o número de partículas fagocitadas. Os resultados foram expressos através do índice fagocítico (IF), onde  $IF = \% \text{ de células mononucleares fagocíticas} \times \text{número médio de leveduras fagocitadas}$ .

#### 4.6.4 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células através da reação de diazotação com o reagente de Griess (composto de 1 g de sulfanilamida (Merck), 0,1 g de dicloro N (1-naftil) etilenodiamina (Merck), 2,5 mL de ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical) e água deionizada q.s.p 100 mL), conforme descrito por Green *et al.* (1982).

Alíquotas de 100  $\mu$ L dos sobrenadantes da cultura de macrófagos pre-ativados e estimulados *in vitro* com as células fúngicas de Pb18 e LevRad, conforme descrito no item 4.6.2, foram acrescidas a 100  $\mu$ L do reagente de Griess. Células cultivadas em

meio RPMI-C, sem qualquer estímulo, bem como aquelas apenas estimuladas com IFN- $\gamma$  murino recombinante foram utilizadas como controle do experimento. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Elx800, Bio-Tek Instruments, Vermont, EUA) em filtro de 540 nm. A concentração do NO liberado no sobrenadante das culturas celulares foi calculada a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio e os valores foram expressos em  $\mu\text{mols de nitrito}/3 \times 10^5$  células.

### **4.6.5 Dosagem de citocinas por ELISA**

As concentrações das citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10) foram quantificadas, no sobrenadante de cultura dos macrófagos obtidos do exsudato peritoneal dos camundongos dos grupos C- e LevRad através do método de ELISA utilizando kits murinos específicos (Duoset – R&D Systems), segundo instruções do fabricante.

O sobrenadante de cultura foi coletado 72 horas após a obtenção, cultivo, estímulo e desafio das culturas de macrófagos, como descrito nos itens 4.6.1, 4.6.2 e 4.6.3, para a dosagem de IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10. Para titulação das citocinas, placas de microcultivo (Nunc) foram sensibilizadas por 18 horas, a 4°C, com anticorpos anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-12 e anti-IL-10 (kits Duoset – R&D Systems). Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução de PBS 1x, pH 7,2, contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T). A ligação não específica foi evitada pela incubação das placas por 1 hora, à temperatura ambiente, com 200  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de PBS 1x, pH 7,2 contendo 1% BSA (PBS/BSA) (Sigma). As placas foram novamente lavadas três vezes com PBS-T e incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de cada sobrenadante de cultura, além da respectiva curva padrão fornecida pelo kit Duoset, numa diluição seriada apropriada em PBS/BSA. Então, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de anticorpo de detecção anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-12 e anti-IL-10 diluído em PBS/BSA (Duoset – R&D Systems). Novamente as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente com 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de estreptavidina conjugada à peroxidase diluída 1:2000 em PBS/BSA. As placas foram lavadas três vezes e a atividade enzimática foi revelada através da incubação com 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de solução reveladora contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida com

solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A leitura das placas foi feita a 450 nm em leitor de ELISA (Elx800, Bio-Tek Instruments, Vermont, EUA) e os resultados foram expressos em pg/mL  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.6.6 Avaliação da capacidade fungicida de macrófagos murinos

Macrófagos murinos foram obtidos e cultivados como descrito no item 4.6.1. Neste ensaio, especificamente, os macrófagos foram depositados diretamente ao fundo dos poços das placas de 96 poços, sem a presença das lamínulas. A cultura de macrófagos obtidas dos grupos C-, C+ e LevRad foi pre-ativada com o IFN- $\gamma$  murino recombinante e, posteriormente, estimulada ou não com as células fúngicas de Pb18. As células foram cultivadas em triplicata a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> 5% durante 6, 24, 48 e 72 h. Após esse período, os sobrenadantes foram desprezados e as placas lavadas com PBS 1x, pH 7,2 estéril para remoção de leveduras não fagocitadas. Em seguida, foi adicionado 1 mL de água destilada estéril gelada em cada poço para lisar os macrófagos e promover a liberação das leveduras que haviam sido internalizadas. Dessa suspensão, 100  $\mu$ L foram semeados em placas de BHI - ágar 1,5% suplementado com soro fetal bovino 4%, sobrenadante de cultura 5% (extrato obtido a partir da amostra Pb18 de *P. brasiliensis*) e gentamicina 1  $\mu$ L/mL. O inóculo das células fúngicas de Pb18 e LevRad, utilizado para o desafio das culturas, foi também semeado e utilizado como controle de proliferação. As placas foram incubadas em estufa BOD a 37 °C sob câmara úmida durante 10-12 dias para contagem das unidades formadoras de colônia fúngica.

#### 4.7 Avaliação *in vivo* da capacidade imunogênica da LevRad

Para avaliar o efeito protetor conferido pela LevRad os camundongos machos BALB/c foram divididos em quatro grupos experimentais: **controle negativo (C-)**, composto por 10 camundongos saudáveis, que não sofreram qualquer tipo de intervenção; **controle positivo (C+)**, composto por 10 camundongos infectados com o *P. brasiliensis* virulento não irradiado que foram submetidos a eutanásia 30 e 90 dias após infecção; **LevRad**, composto por 20 camundongos imunizados com o *P. brasiliensis* irradiado que foram submetidos a eutanásia 15 dias após inoculação; **LevRad\***, composto por 40 camundongos imunizados duas ou três vezes consecutivas com a LevRad, desafiados com *P. brasiliensis* virulento não irradiado 30 dias após a última imunização e submetidos a eutanásia 30 e 90 dias depois.

Os grupos **LevRad** e **LevRad\*** foram subdivididos em 4 grupos experimentais : **SUB2X**, composto por 10 animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **SUB3X**, composto por 10 animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea; **END2X** composto por 10 animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **END3X** composto por 10 animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa.

Os órgãos (baço, fígado e pulmão) removidos dos animais submetidos à eutanásia foram utilizados em ensaios para a determinação das UFC, análise histopatológica, análise da proliferação celular e quantificação dos níveis transcritos de citocinas, conforme descritos nos itens 4.7.3, 4.7.4 4.7.10 e 4.7.11. Os soros obtidos antes e 15, 30 e 45 dias após a segunda ou terceira imunização foram utilizados para caracterização da resposta imune humoral de acordo com descrito nos itens 4.7.6 - 4.7.9.

### **4.7.1 Imunizações pelas vias endovenosa (i.v.) e subcutânea (s.c.)**

Os camundongos machos BALB/c com 6-8 semanas foram previamente imunizados duas ou três vezes consecutivas, em intervalo de 15 dias, tanto pela via endovenosa quanto pela via subcutânea, utilizando  $10^5$  células viáveis da LevRad em 50  $\mu$ L de PBS 1x estéril, pH 7,2, sem adição de adjuvante. Apenas os animais imunizados pela via endovenosa foram anestesiados i.m como descrito no item 4.5.

### **4.7.2 Infecção intratraqueal (i.t.)**

Os camundongos machos BALB/c foram previamente anestesiados i.m. como descrito no item 4.5. Em seguida, os animais foram submetidos a uma pequena intervenção, onde uma incisão transversal de aproximadamente 1 cm foi realizada na região ventral superior do animal para exposição da traquéia. Finalmente,  $3 \times 10^5$  células leveduriformes viáveis de *P. brasiliensis* virulento não irradiado (Pb18) em 50  $\mu$ L de PBS 1x estéril, pH 7,2 foram injetados dentro da traqueia exposta com o auxílio de uma seringa de insulina 8mm e agulha de 30-gauge. O corte foi suturado utilizando fio de nylon número 4.

### **4.7.3 Determinação das UFC**

Parte dos órgãos (pulmão, baço e fígado) removidos dos camundongos submetidos à eutanásia foram pesados e depois macerados em 1 mL da solução de PBS

1x estéril. Em seguida, 100 µl da solução foram semeadas, homogeneamente, em meio BHI – ágar suplementado com soro fetal bovino 4%, sobrenadante de cultura 5% (amostra Pb18 de *P. brasiliensis*) e gentamicina 1 µL/mL. Após 20 a 30 dias de incubação das placas à 37°C, as colônias foram contadas e os resultados expressos em número de UFC por grama de tecido por camundongo (UFC/g).

#### 4.7.4 Histologia

Outra parte dos órgãos (pulmão, baço e fígado) removidos dos animais submetidos à eutanásia foi preservada em solução de formaldeído 4% e, utilizada para confecção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina. Os cortes histológicos foram examinados ao microscópio óptico em aumento de 40X, 100X e 400X.

#### 4.7.5 Proliferação de esplenócitos

O baço dos camundongos dos grupos C-, C+, LevRad e LevRad\* removidos 15 dias antes da última imunização e 30 e 90 dias após a infecção desafio foram utilizados para avaliação da proliferação dos esplenócitos cultivados na ausência ou presença de estímulos antigênicos a partir da incorporação da Timidina Tritiada (<sup>3</sup>H-timidina).

Primeiramente, os baços foram macerados, individualmente, em meio RPMI incompleto (RPMI-I) (Gibco, Carlsbad, EUA) para obtenção dos esplenócitos. Em seguida, as células do baço foram lavadas duas vezes consecutivas em PBS 1X estéril, pH 7,2, através de centrifugações sucessivas a 1200 rpm com duração de 10 minutos cada. A lise das hemácias foi realizada a partir da adição de 9 mL de água deionizada estéril, seguida, imediatamente, pela adição de 1 mL de PBS 10x estéril. As células foram então centrifugadas a 1200 rpm com duração de 10 minutos, lavadas com meio RPMI-I e centrifugadas novamente. Ao final das lavagens, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 estéril suplementado com soro fetal bovino 10%, HEPES 3,6 g/L, aminoácidos não essenciais 11 µL/mL, piruvato de sódio 110 µL/mL, penicilina G sódica 100 U/mL e sulfato de estreptomicina 110 µg/mL (RPMI-C) e a concentração celular ajustada para 1 x 10<sup>6</sup> células/poço. As células foram cultivadas por cinco dias, em placas de 96 poços (Nunc), a 37 °C, em estufa de CO<sub>2</sub> 5% na presença de somente meio RPMI-C ou de cada estímulo antigênico: Concanavalina (ConA) (5µg/mL), extrato total de *P. brasiliensis* não irradiado (ePb18) e extrato total

de *P. brasiliensis* irradiado (ePb18\*) (25 µg/mL). O mitógeno ConA foi utilizado como controle positivo da proliferação celular. No período de 18h restantes de cultura, foi adicionada <sup>3</sup>H-timidina 0,5 µCi/poço (Amersham Life Sciences) e a incorporação do isótopo foi medida por espectroscopia de cintilação líquida (Beckman). Os resultados foram expressos como a média de triplicatas da contagem por min. (cpm).

### **4.7.6 Obtenção dos soros de camundongos**

Amostras de sangue dos camundongos infectados, com *P. brasiliensis* não irradiado e os inoculados com o fungo irradiado, foram coletados antes e 15, 30 e 45 dias após a segunda ou terceira imunização. O sangue dos animais imunizados e, posteriormente desafiados foi coletado 30 e 90 dias após a infecção desafio. O sangue dos camundongos não infectados foi coletado com a mesma frequência. As amostras foram armazenadas por 1h a 37 °C e, posteriormente, centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos. Os soros obtidos foram estocados a -20°C para posterior realização de ensaios imunoenzimáticos de ELISA.

### **4.7.7 Preparação do exoantígeno de *P. brasiliensis* (MEXO)**

As colônias não irradiadas de *P. brasiliensis*, crescidas em meio YPD-ágar durante 7 dias foram ressuspendidas em PBS 1x, Ph 7,2, vortexadas por 30` e centrifugadas em uma rotação de 12000 rpm por 30 min, a 4 °C. O sobrenadante coletado foi filtrado em filtro estéril 0.45mm (millipore) e armazenado a -20 °C (Reis *et al.*, 2005). A dosagem de proteína foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

### **4.7.8 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford**

Primeiramente, uma curva padrão de diluição 0,5 a 1,5 µg de proteína/20 µL de H<sub>2</sub>O foi realizada utilizando-se uma solução padrão de albumina bovina (BSA) 1 mg/mL. Concomitantemente a essa curva, 20 µL da amostra a ser dosada foi adicionada, em duplicata, a cada poço da placa de microtitulação de 96 poços, juntamente com 180 µL do reagente de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,1% em solução aquosa contendo etanol 5% e ácido fosfórico 10%, filtrado em papel de filtro número 1). A placa foi mantida por 5 a 10 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz e os valores de absorbância determinados a 595 nm em leitor de Elisa

(Elx800, Bio-Tek Instruments. Inc.). Os valores obtidos foram comparados com a curva padrão de BSA conforme a fórmula:

Concentração de proteína = Abs x Fc x Fd x Cv. No qual:

- Abs: média das leituras das amostras em duplicata
- Fc: fator de conversão = concentração de proteína para cada ponto da curva de BSA.
- Fd: fator de diluição
- Cv: fator de correção de volume para obter-se a concentração em µg/mL.

### 4.7.9 ELISA

As reações imunoenzimáticas (LUNDE *et al.*, 1979) foram realizadas em placas de microtitulação MaxiSorb™ Surface (NUNC™ Brand Products) de 96 poços sensibilizadas com 0,5 µg/100µL de MEXO em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M, pH 9,6, por 1h a 37°C. As placas foram lavadas cinco vezes com tampão PBS 0,005M/Tween 0,5% e o bloqueio dos sítios livres foi feito com 150 µL de PBS 0,15M/Caseína 1,6% a 37°C. Após 1h, as placas foram novamente lavadas e, em seguida os soros dos camundongos foram diluídos em PBS 10X/Caseína 0,25% (PBS-C) e incubados, em duplicata, por 1h a 37 °C. Os poços foram novamente lavados, como descrito anteriormente e, posteriormente, incubados com 100 µL do anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Anti-mouse IgG – whole molecule – peroxidase conjugate, diluído 1:5000 em PBS-C e Goat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 peroxidase conjugate diluído 1:5000 em PBS-C por 1h a 37 °C). Após a última lavagem, as placas foram reveladas com 100 µL de solução reveladora Tetrametilbenzidina (TMB) pré corado (bti-bio tecnologia industrial LTDA). A reação foi interrompida após 10 minutos com 20µL de solução de ácido sulfúrico (2N) e a absorbância foi determinada a 490 nm em leitor de Elisa (Elx800, Bio-Tek, instruments. Inc.).

### 4.7.10 Detecção de citocinas por PCR em tempo real

Ensaio de PCR em tempo real foram realizados para quantificar os níveis transcritos de citocinas e iNOS no pulmão dos animais submetidos à vacinação profilática e terapêutica. Para isso, o RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol LS Reagent (Invitrogen Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Após as extrações, as amostras foram incubadas com 1 u/µg de RNase livre

de DNase (Promega) por 30 minutos a 37 °C. As amostras foram purificadas pelo método fenol-clorofórmio (Sigma) e, em seguida, submetidas novamente a precipitação com etanol 75% (Sigma). A concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas em espectrofotômetro a 260 nm (Eppendorf Biophotometer). A qualidade do material nucléico extraído foi avaliada pela relação  $OD_{260}/OD_{280} > 1.6$ . As concentrações finais das amostras extraídas foram padronizadas em 0,2 µg/µL. O RNA extraído foi utilizado para a produção de cDNA com o Kit da Fermentas Life sciences, RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis, seguindo as recomendações do fabricante.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema de detecção ABIPrism 7900 (Applied Biosystems). Após síntese de cDNA, as reações de PCR foram conduzidas utilizando 10 µl do reagente Syber®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 4,0 µl da amostra de cDNA e 1 µl de cada primer específico a 5 pmol, em um volume final de 20 µl. As seqüências dos iniciadores específicos para as citocinas (IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ), para a enzima iNOS e o gene constitutivo  $\beta$ -actina foram obtidos, com base em Giulietti e colaboradores (2001), usando o “Primer Express® software v2.0” (Applied Biosystems). As condições de termociclagem iniciaram-se com a incubação da placa (Applied Biosystem) a 50 °C por 2 minutos e, posteriormente 95 °C por 10 minutos, seguidos por 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. As curvas de dissociação ocorreram a uma temperatura de 95 °C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica normalizada em relação ao gene constitutivo,  $\beta$ -actina. O método de Ct comparativo foi utilizado para a quantificação relativa dos níveis de expressão do gene alvo em questão em relação a um calibrador (amostra dos animais não infectados), a partir da equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (amostra) -  $\Delta Ct$  (calibrador). O  $\Delta Ct$  (amostra) é o Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene constitutivo. O gene foi considerado diferencialmente expresso quando apresentou níveis de citocinas e iNOS expressos duas vezes mais em relação ao calibrador.

#### **4.7.11 Dosagem de citocinas por ELISA**

As concentrações das citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4) foram quantificadas no sobrenadante de cultura dos esplenócitos obtidos de camundongos dos grupos C-, C+,

LevRad e LevRad\*, através do método de ELISA utilizando kits murinos específicos (DuoSet – R&D Systems), como descrito no item 4.6.5.

Após a maceração dos baços dos camundongos obtidos 15 dias antes e 30 e 90 dias após a infecção desafio, os esplenócitos foram isolados e cultivados em placas de 24 poços contendo o meio RPMI-C (Gibco) em uma concentração final de  $5 \times 10^6$  células, na ausência ou na presença dos seguintes estímulos: Concanavalina (ConA) (5mg/mL), extrato total de *P. brasiliensis* não irradiado (ePb18) e extrato total de *P. brasiliensis* irradiado (ePb18\*) (25 µg/mL). Foi adicionada às culturas celulares a solução de polimixina B (30 µg/mL) para impedir completamente a produção de citocinas em resposta ao LPS (FARIAS, 2010). As culturas foram mantidas a 37°C, em estufa 5% CO<sub>2</sub> durante 72h. O sobrenadante da cultura foi coletado após 72h para a dosagem de IFN-γ, IL-10, TGF-β e IL-4.

#### 4.8 Avaliação do potencial da vacinação terapêutica

Para avaliar a eficácia da vacinação terapêutica, os camundongos anestesiados, conforme descrito no item 4.5, foram infectados pela via intratraqueal com  $3 \times 10^5$  células viáveis de *P. brasiliensis* virulento não irradiada. Em seguida, os animais foram tratados, intraperitonealmente, com a LevRad (grupo InRad) ou com a LevRad associada ao fluconazol 10 mg/Kg (Mantena laboratories limited) (grupo InRadMed), 30 dias após a infecção. A LevRad foi administrada em duas doses, com intervalo de 15 dias cada, enquanto o fluconazol foi administrado, em intervalos de 24 horas, por 30 dias seguidos. Grupos de animais que não sofreram qualquer intervenção (C-), infectados/não tratados (C+) e infectados/tratados com o fluconazol (InMed) foram utilizados como controles.

Os camundongos BALB/c foram divididos em 5 grupos experimentais:

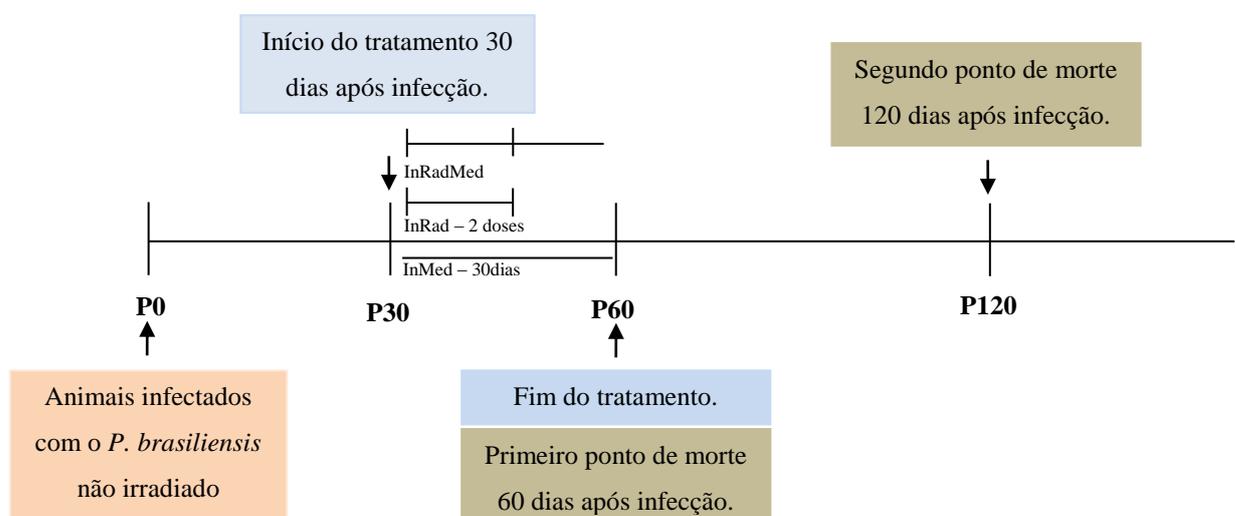
- **Grupo controle negativo (C-)**, composto por 10 camundongos que não sofreram qualquer tipo de intervenção.
- **Grupo controle positivo (C+)**, composto por 10 camundongos infectados com o *P. brasiliensis* não irradiado e submetidos a eutanásia 60 e 120 dias após infecção.
- **Grupo controle infectado e submetido ao tratamento com o anti-fúngico (InMed)**, composto por 10 camundongos infectados com o *P. brasiliensis* não irradiado, submetidos ao tratamento com o fluconazol 30 dias após a infecção. O

tratamento foi administrado a cada 24h por 30 dias seguidos. Os animais foram submetidos à eutanásia 60 e 120 dias após infecção.

- **Grupo infectado e submetido ao tratamento com a LevRad (InRad)**, composto por 10 camundongos infectados com o *P. brasiliensis* não irradiado, submetidos ao tratamento com a LevRad 30 dias após a infecção. O tratamento foi administrado em duas doses, com intervalo de 15 dias. Os animais foram submetidos à eutanásia 60 e 120 dias após infecção.
- **Grupo infectado e submetido ao tratamento com a LevRad associada a droga antifúngica (InRadMed)**, composto por 10 camundongos infectados com o *P. brasiliensis* não irradiado, submetidos ao tratamento com a LevRad associada ao fluconazol 30 dias após a infecção. O tratamento com a LevRad foi administrado em duas doses com intervalo de 15 dias associado ao fluconazol, que foi administrado a cada 24h por 30 dias consecutivos. Os animais foram submetidos à eutanásia 60 e 120 dias após infecção.

Os órgãos (baço, fígado e pulmão) removidos dos animais submetidos à eutanásia foram utilizados em ensaios para a determinação das UFC, análise histopatológica e quantificação dos níveis transcritos de citocinas, conforme descritos nos itens 4.7.3, 4.7.4 e 4.7.10. Os soros obtidos antes (P0) e 30 (P30), 60 (P60) e 120 (P120) dias após a infecção foram utilizados para caracterização da resposta imune humoral de acordo com descrito no item 4.7.6-4.7.9.

## ESQUEMA EXPERIMENTAL



Fonte: Elaborada pela autora, 2012.

### **4.9 Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados através do teste "one way ANOVA" (análise de variância) utilizando o teste posterior de Bonferroni, realizado pelo programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad, CA – USA). Foram considerados significativos os valores onde o  $p < 0,05$  em um  $n = 5$  animais por grupo.

**V RESULTADOS**

## 5.1 Avaliação da perda da capacidade infecciosa da LevRad

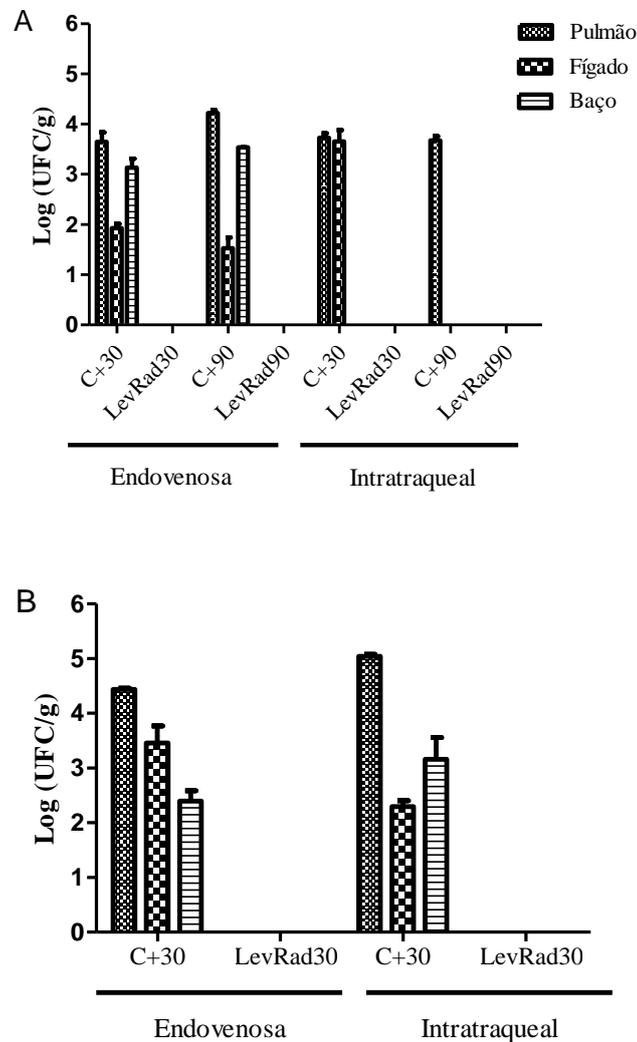
A perda da capacidade infecciosa das células leveduriformes de *P. brasiliensis* irradiado (LevRad) foi avaliada em animais imunodeprimidos (Nude e BALB/c\*) e imunocompetentes (BALB/c), infectados por via intratraqueal e endovenosa, a partir da determinação das unidades formadoras de colônias (UFC) e análise histopatológica dos órgãos dos animais infectados.

### 5.1.1 Determinação das UFC

A perda da infectividade do *P. brasiliensis* foi inicialmente avaliada a partir da contagem de UFC/g nos órgãos dos camundongos imunodeprimidos (Nude e BALB/c\*) e imunocompetentes (BALB/c) sacrificados 30 e/ou 90 dias após a infecção com a LevRad. Os camundongos infectados com o fungo virulento não irradiado foram utilizados como controle positivo (C+). Animais que não sofreram qualquer intervenção foram utilizados como controle negativo (C-).

Não foram recuperadas UFC nos órgãos (pulmão, fígado e baço) dos camundongos imunocompetentes (BALB/c) e imunodeprimidos (BALB/c\*) analisados 30 e/ou 90 dias após a inoculação endovenosa ou intratraqueal com a LevRad. Ao contrário, os animais imunocompetentes e imunodeprimidos do grupo C+ apresentaram quantidades elevadas de UFC nos órgãos examinados (Fig. 2A e B). Os camundongos Nude, que são destituídos de timo e, portanto não apresentam imunidade dependente de linfócitos T, quando infectados com as células leveduriformes de *P. brasiliensis* virulento não irradiado (Pb18) morreram dentro dos cinco primeiros dias após infecção, enquanto os camundongos Nude inoculados com a LevRad permaneceram vivos por 30 dias, quando foram submetidos à eutanásia (Fig. 3).

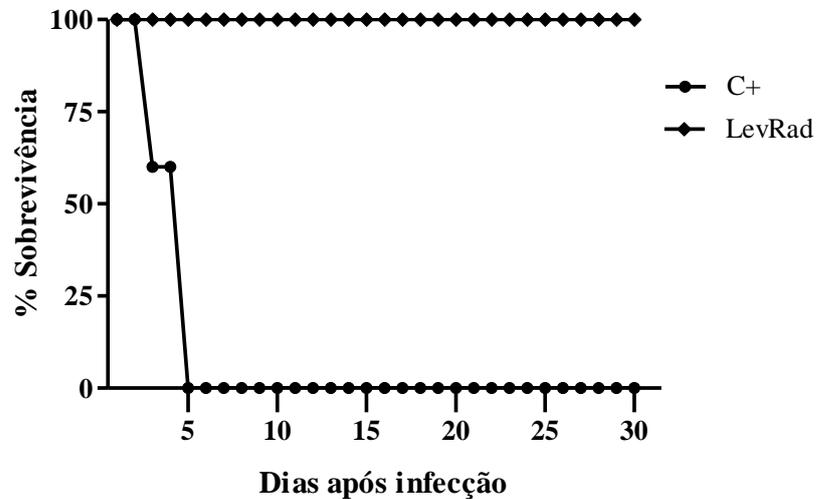
FIGURA 2 - Determinação de UFC nos órgãos dos camundongos imunocompetentes (A) e imunodeprimidos (B) infectados com a LevRad.



**Legenda:** (A) UFC nos órgãos dos camundongos imunocompetentes (BALB/c) determinadas 30 (LevRad30 e C+30) e 90 (LevRad90 e C+90) dias após infecção endovenosa ou intratraqueal com  $3 \times 10^5$  células leveduriformes viáveis de *P. brasiliensis* irradiado (LevRad) ou não irradiado (Pb18).

(B) UFC nos órgãos dos camundongos imunodeprimidos (BALB/c\*) determinadas 30 dias após infecção endovenosa ou intratraqueal com  $3 \times 10^5$  células leveduriformes viáveis da LevRad ou do Pb18. Os dados obtidos foram expressos em  $\text{Log}_{10}$  da média  $\pm$  o desvio padrão das UFC por grama de tecidos dos animais. O mesmo experimento foi realizado três vezes com resultados similares, utilizando  $n=5$  animais.

FIGURA 3 - Curva de sobrevivência dos camundongos Nude após infecção com *P. brasiliensis* irradiado (LevRad) ou não irradiado (C+).



**Legenda:** Os camundongos Nude foram infectados i.t. com  $3 \times 10^5$  células leveduriformes viáveis da LevRad ou Pb18 não irradiado e avaliados durante um período de 30 dias. Experimento realizado com  $n=3$ .

### 5.1.2 Análises histopatológicas dos órgãos dos camundongos infectados

Os órgãos (pulmão, fígado e baço) dos camundongos imunocompetentes (BALB/c) e o pulmão dos imunodeprimidos (Nude e BALB/c\*) infectados com *P. brasiliensis* não irradiado (C+) e irradiado (LevRad) foram removidos 30 e/ou 90 dias após infecção para análise das alterações histopatológicas. Os animais que não sofreram qualquer intervenção foram utilizados como controle negativo (C-).

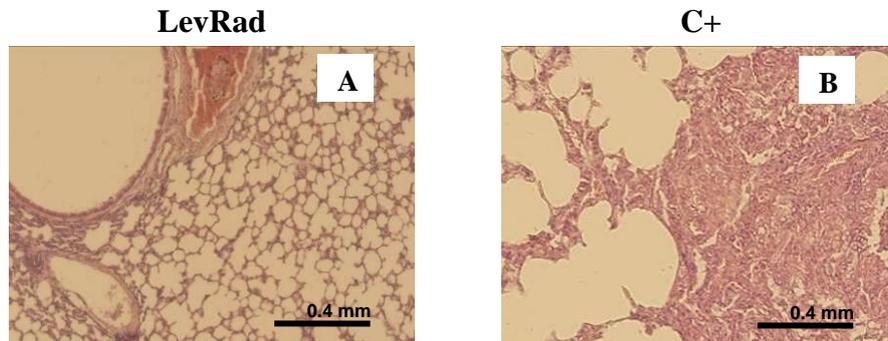
Não houve presença de infiltrados inflamatórios e lesões granulomatosas nos pulmões dos animais imunodeprimidos (BALB/c\*) infectados com a LevRad, analisados 30 dias após infecção (Fig.4A). O mesmo não foi observado no pulmão dos animais imunodeprimidos (Nude) analisados 30 dias após infecção com a LevRad (dados não mostrados). Ao contrário, os pulmões dos animais imunodeprimidos (BALB/\*), analisados 30 dias após infecção i.t. e i.v com o *P. brasiliensis* não irradiado (Pb18), apresentaram lesões granulomatosas multifocais a coalescentes com extenso comprometimento do tecido pulmonar e inúmeras células fúngicas (Fig. 4B). Os camundongos Nude infectados i.t. com o Pb18 não irradiado, morreram aproximadamente três a cinco dias após infecção.

Os animais imunocompetentes (BALB/c) infectados com a LevRad e os animais não infectados (C-) também não apresentaram infiltrados inflamatórios e lesões granulomatosas em nenhum dos órgãos (pulmão, fígado e baço) analisados 30 e 90 dias após infecção (Fig. 5). Porém, os pulmões dos animais imunocompetentes, analisados 30 dias após a infecção intratraqueal com o *P. brasiliensis* virulento não irradiado (Pb18), apresentaram granulomas multifocais a coalescentes em intensa quantidade, parcialmente delimitados e entremeados por tecido conjuntivo fibroso (Fig. 6A). Os fígados apresentaram granulomas médios multifocais aleatórios bem organizados e em quantidade discreta com poucas células fúngicas em seu interior (Fig. 6B). Já o baço não apresentou alterações histopatológicas (Fig. 6C). Após 90 dias, os pulmões apresentaram focos pequenos e discretos de infiltrados inflamatórios com poucas células fúngicas em seu interior (Fig. 6D). Os fígados apresentaram granulomas bem organizados pequenos multifocais aleatórios e discretos (Fig. 6E). Já o baço não apresentou alterações histopatológicas em nenhum dos pontos analisados (Fig. 6F).

Os pulmões dos animais imunocompetentes, analisados 30 dias após a infecção endovenosa com o *P. brasiliensis* virulento não irradiado (Pb18), apresentaram lesões granulomatosas multifocais a coalescentes, caracterizadas por extensa destruição do tecido pulmonar, com inúmeras células fúngicas (Fig. 6G). Os fígados dos animais apresentaram granulomas médios multifocais aleatórios em discreta quantidade circundados parcialmente por tecido conjuntivo fibroso e células fúngicas em seu interior (Fig. 6H). O baço apresentou granulomas pequenos multifocais aleatórios e discretos com poucas células fúngicas em seu interior (Fig. 6I). Não houve alteração do perfil histopatológico nos órgãos dos animais analisados 90 dias após infecção endovenosa com amostras virulentas do fungo não irradiado (dados não mostrados).

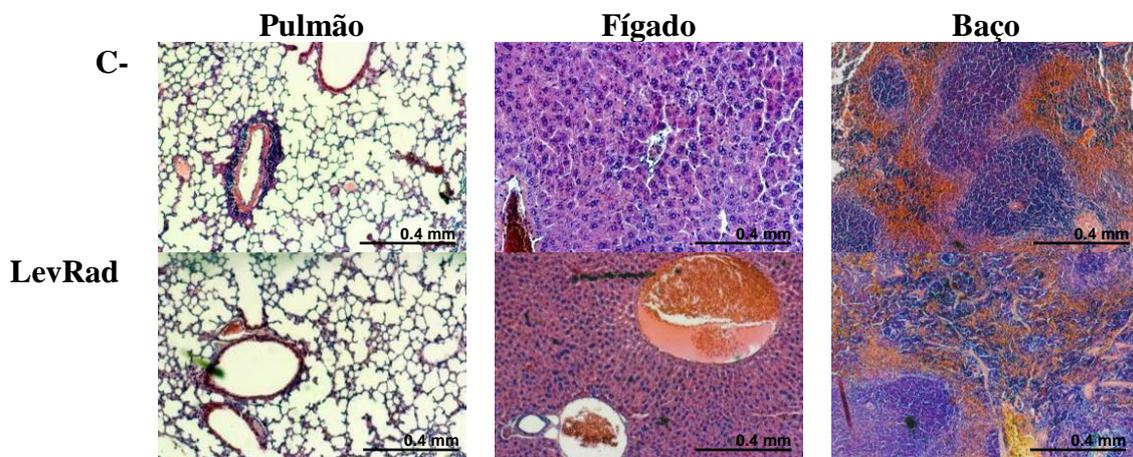
Os resultados encontrados na análise histológica consolidaram os obtidos anteriormente no ensaio para a detecção de UFC. Não foram observadas lesões histopatológicas em nenhum dos órgãos analisados dos animais imunocompetentes e imunodeprimidos infectados com a LevRad. Ao contrário, foram observadas lesões compatíveis com os resultados de UFC recuperadas dos tecidos desses animais quando infectados com a amostra de *P. brasiliensis* não irradiado (C+).

FIGURA 4 - Histopatologia representativa das lesões causadas pelo *P. brasiliensis* irradiado (LevRad) e não irradiado (C+) no pulmão dos camundongos imunodeprimidos (BALB/c\*).



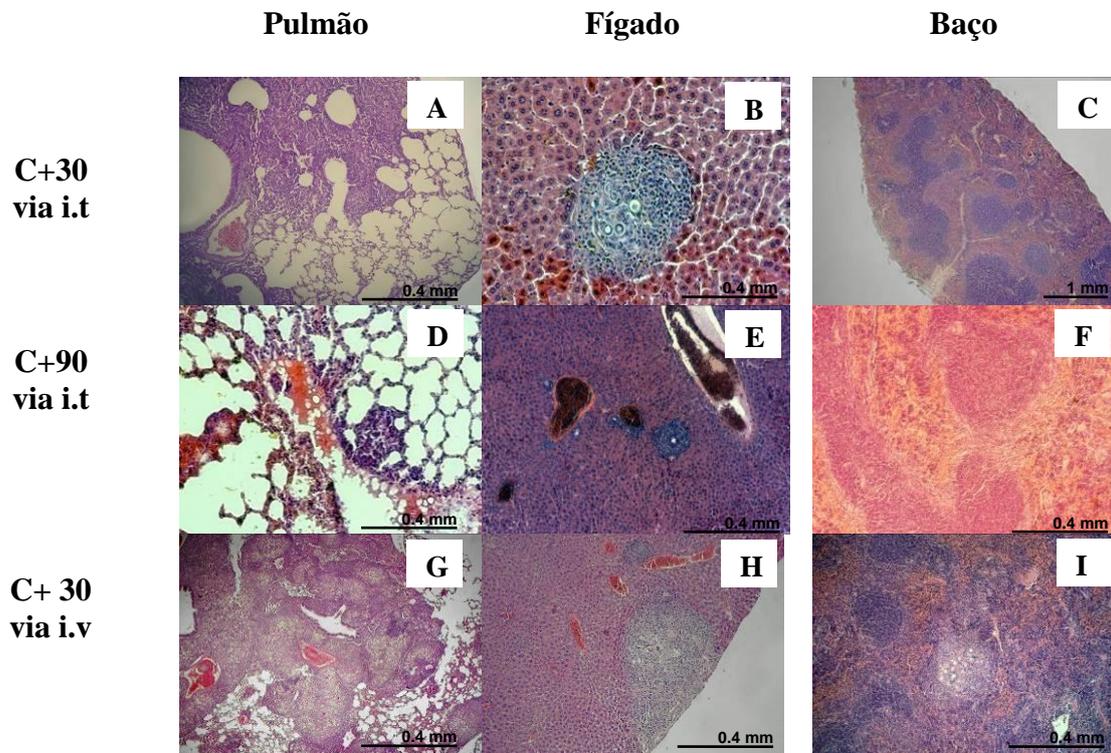
**Legenda:** Os órgãos dos animais foram analisados 30 dias após a infecção. **Em A-** pulmão dos animais infectados com a LevRad sem lesão (HE, 4X). **Em B-** pulmão dos animais do grupo controle positivo mostrando extensa lesão granulomatosa multifocal coalescentes (HE, 100X). A barra preta representa a escala da foto.

FIGURA 5 - Histopatologia representativa dos órgãos dos camundongos imunocompetentes BALB/c infectados com a LevRad, analisados 30 dias depois.



**Legenda:** Não houve alterações histopatológicas e, nem presença de células fúngicas em nenhum dos órgãos analisados. Os órgãos dos animais que não sofreram qualquer intervenção foram utilizados como controle negativo (C-). A barra preta representa a escala da foto (aumento de 100X). Coloração por HE.

FIGURA 6 - Histopatologia representativa das lesões causadas pelo *P. brasiliensis* não irradiado nos órgãos dos camundongos imunocompetentes BALB/c infectados por via intratraqueal e endovenosa.



**Legenda:** Os órgãos dos animais infectados foram analisados 30 e 90 dias após infecção. **Em A-** pulmão mostrando extensa lesão granulomatosa multifocal a coalescente (HE, 100X); **Em B-** fígado com granuloma compacto médio circundado por tecido conjuntivo fibroso, contendo estruturas compatíveis a células fúngicas em seu interior (HE, 100X); **Em C-** baço sem alteração histopatológica (HE, 40X); **Em D-** pulmão com infiltrados inflamatórios focal sem estruturas fúngicas visíveis (HE, 100X); **Em E-** fígado com granuloma pequeno e organizado (HE, 100X); **Em F-** baço sem alteração histopatológica (HE, 100X); **Em G-** extensa lesão granulomatosa multifocal a coalescente (HE, 100X); **Em H-** fígado com granuloma médio(HE, 100X); **Em I-** baço com granuloma pequeno (HE, 100X). A barra preta representa a escala da foto.

### 5.1.3 Sumário dos resultados

Em resumo, não houve recuperação de UFC e nem alterações histopatológicas em nenhum dos órgãos (pulmão, fígado e baço) dos camundongos imunocompetentes (BALB/c) e imunodeprimidos (BALB/c\* e Nude) infectados via intratraqueal e endovenosa com as células leveduriformes de *P. brasiliensis* atenuadas por irradiação gama (LevRad). Esses resultados demonstram a inabilidade da LevRad provocar infecção, mesmo em animais imunodeprimidos.

## 5.2 AVALIAÇÃO *in vitro* DA CAPACIDADE IMUNOGÊNICA DA LevRad EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS

A capacidade imunogênica da LevRad foi avaliada a partir de ensaios para determinar a atividade fagocítica, a capacidade fungicida, a concentração de NO e os níveis de citocinas em macrófagos peritoneais obtidos dos camundongos BALB/c dos grupos C-, C+ e LevRad.

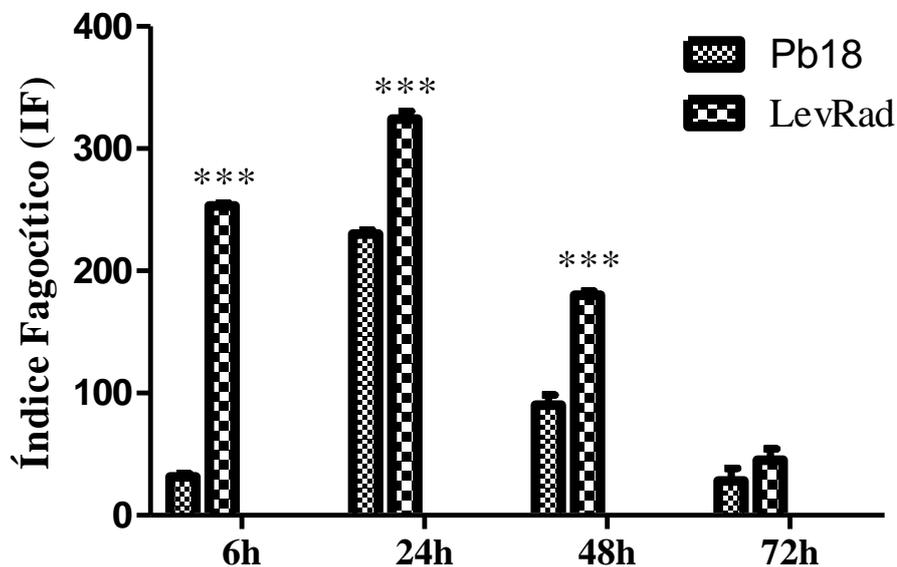
### 5.2.1 Índice fagocítico de macrófagos peritoneais desafiados *in vitro* com a LevRad

Para avaliar o índice fagocítica,  $3 \times 10^5$  macrófagos peritoneais provenientes dos animais que não sofreram qualquer intervenção (C-) foram cultivados em meio RPMI-C pré-ativados com IFN- $\gamma$  (100U/mL), durante um período de 18h, e estimulados *in vitro* com  $6 \times 10^4$  células leveduriformes de *P. brasiliensis* irradiadas (LevRad) por 6, 24, 48 e 72h. O índice fagocítica em macrófagos desafiados com as LevRad foi comparado ao estímulo com as células fúngicas de Pb18. Macrófagos, ativados ou não com o IFN- $\gamma$ , cultivados em meio RPMI-C na ausência de estímulo foram utilizados como controle de experimento.

Como mostrado na figura 7, as células fúngicas irradiadas (LevRad) e não irradiadas (Pb18) foram capazes de estimular *in vitro* a fagocitose dos macrófagos peritoneais pré-ativados pelo IFN- $\gamma$ . Os macrófagos peritoneais desafiados com a LevRad apresentaram em todos os tempos analisados maior índice fagocítico do que os desafiados com o fungo não irradiado ( $p < 0,001$ ). A atividade fagocítica foi precoce (6h) em macrófagos estimulados com a LevRad, com um pico máximo em 24h após o desafio e decréscimo 48 e 72h depois.

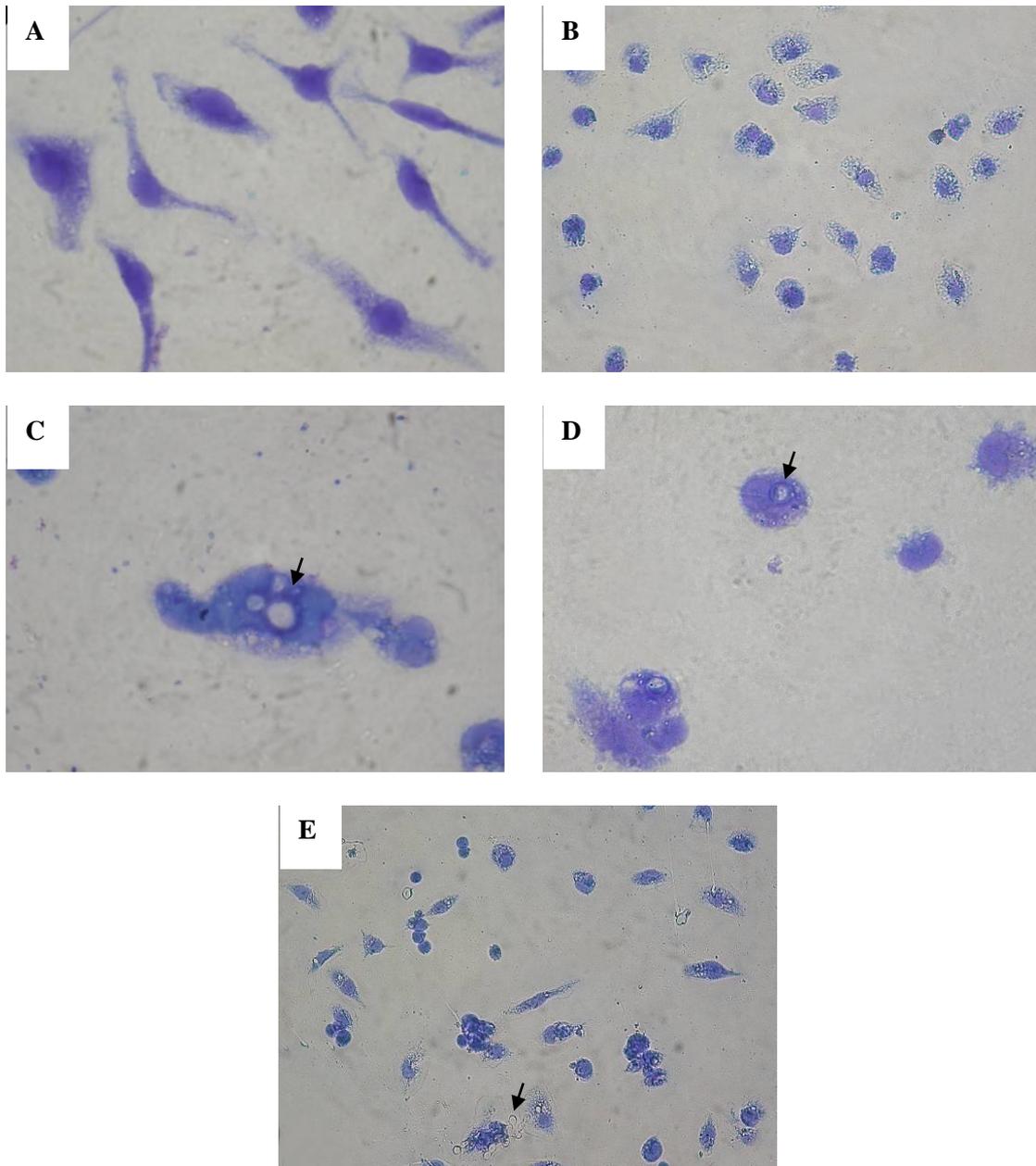
A figura 8 mostra as leveduras de *P. brasiliensis* fagocitadas por macrófagos peritoneais ativados ou não com o IFN- $\gamma$  e cultivados na ausência ou presença dos estímulos (Pb18 ou LevRad).

FIGURA 7 - Índice fagocítico (IF) de macrófagos peritoneais, pré - ativados com o IFN- $\gamma$  e estimulados *in vitro* com as células leveduriformes viáveis de *P. brasiliensis* irradiado (LevRad) e não irradiado (Pb18).



**Legenda:** As culturas foram cultivadas em meio RPMI-C por 6, 24, 48 e 72h em CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. A contagem do número de leveduras fagocitadas foi realizada por microscopia óptica e o cálculo do IF determinado conforme a equação: IF = % de células mononucleares fagocíticas x número médio de leveduras fagocitadas. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos em triplicata de 2 experimentos representativos. \*\*\* representa diferença significativa em relação ao desafio com o Pb18 ( $p < 0.001$ ).

FIGURA 8 – Imagem ilustrativa das leveduras de *P. brasiliensis* fagocitadas por macrófagos peritoneais ativados ou não com o IFN- $\gamma$  e cultivados na ausência ou presença de estímulo (Pb18 ou LevRad).



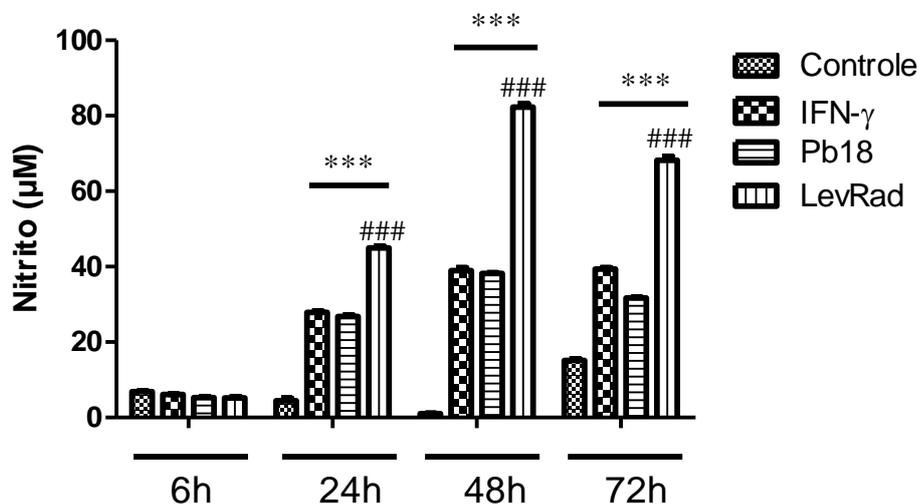
**Legenda:** Em A- Macrófagos não ativados cultivados sem estímulo em meio RPMI-C; Em B, Macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  cultivados sem estímulo em meio RPMI-C; Em C, D e E - Macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  cultivados na presença de estímulo (LevRad ou Pb18) em meio RPMI-C.

### 5.2.2 Dosagem de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais ativados e estimulados

A concentração do óxido nítrico (NO) foi determinada indiretamente a partir da formação de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no sobrenadante de cultura dos macrófagos pré-ativados com o IFN- $\gamma$  após o estímulo com a LevRad. Os níveis de NO em macrófagos desafiadas com a LevRad foram comparadas ao estímulo com o Pb18 não irradiado. Macrófagos de animais, ativados ou não com o IFN- $\gamma$ , cultivados em meio RPMI-C na ausência de estímulo foram utilizados como o controle de cultura.

Os resultados observados na figura 9 mostram o aumento significativo da concentração de NO, a partir de 24hs, nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais pré-ativados, estimulados ou não *in vitro* com o Pb18 e a LevRad, em relação aos macrófagos cultivados sem qualquer estímulo. A produção de NO por macrófagos ativados que foram estimulados com a LevRad foi significativa em relação aos níveis produzidos por macrófagos estimulados com o Pb18 e não estimulados aos (IFN- $\gamma$ ) ( $p < 0.001$ ).

FIGURA 9 - Concentração de  $\text{NO}_2^-$  no sobrenadante de cultura dos macrófagos peritoneais, pré-ativados com o  $\text{IFN-}\gamma$ , estimulados ou não *in vitro* com as células viáveis de *P. brasiliensis* irradiado (LevRad) e não irradiado (Pb18).



**Legenda:** Os macrófagos pré-ativados e estimulados foram cultivados por 6, 24, 48 e 72h para a determinação indireta de NO a partir da reação de Griess. Macrófagos não ativados cultivados em meio sem estímulo foram utilizados como controle. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos em triplicata de 2 experimentos representativos. \*\*\* representa diferença significativa em relação aos macrófagos não ativados cultivados no meio sem estímulo ( $p < 0.001$ ). ### representa diferença significativa em relação aos macrófagos apenas ativados ou desafiados em cultura pelo fungo não irradiado ( $p < 0.001$ ).

### 5.2.3 Perfil de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais ativados e desafiados

Para avaliar o perfil de citocinas *in vitro* produzida em resposta a LevRad, os sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais pré-ativados foram coletados após 24h para a dosagem de  $\text{TNF}\alpha$  e 72h para a dosagem de  $\text{IFN-}\gamma$ , IL-4 e IL-10, utilizando kit de ELISA Duoset (R&D Systems, EUA). O perfil das citocinas em macrófagos estimulados com a LevRad foram comparadas ao estímulo com o Pb18. Macrófagos de animais, ativados ou não com o  $\text{IFN-}\gamma$ , cultivados em meio RPMI-C na ausência de estímulo foram utilizados como o controle.

A figura 10 mostra a produção significativa de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de cultura dos macrófagos desafiados *in vitro* tanto com o Pb18 quanto com a LevRad, em relação aos macrófagos pré-ativados ou não com o IFN- $\gamma$ , cultivados na ausência de estímulo ( $p < 0.001$ ). LevRad induziu a produção significativa dessa citocina em relação ao Pb18 ( $p < 0.01$ ).

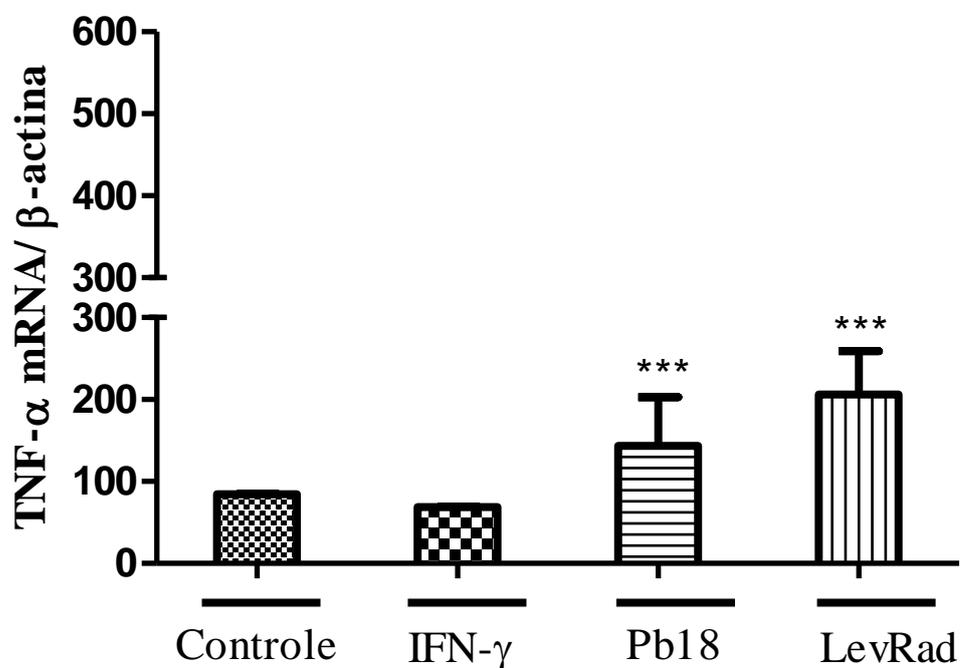
Houve produção significativa de IFN- $\gamma$  por macrófagos pré-ativados estimulados ou não com o Pb18 ou com a LevRad, em relação aos não estimulados ( $p < 0.001$ ), mas não em relação um ao outro. (Fig. 11).

Em relação ao IL-12, não houve diferença significativa quanto a secreção desta citocina por macrófagos pré-ativados e estimulados com a LevRad ou com o Pb18, em relação aos macrófagos ativados não estimulados (IFN- $\gamma$ ) (Fig. 12).

Os níveis da citocina IL-10, detectados no sobrenadante de cultura dos macrófagos pré-ativados ou não com o IFN- $\gamma$  desafiados com a LevRad apresentaram-se significativamente elevados ( $p < 0.001$ ), em relação aos estimulados com o Pb18 ou aos não estimulados em cultura (Fig.13).

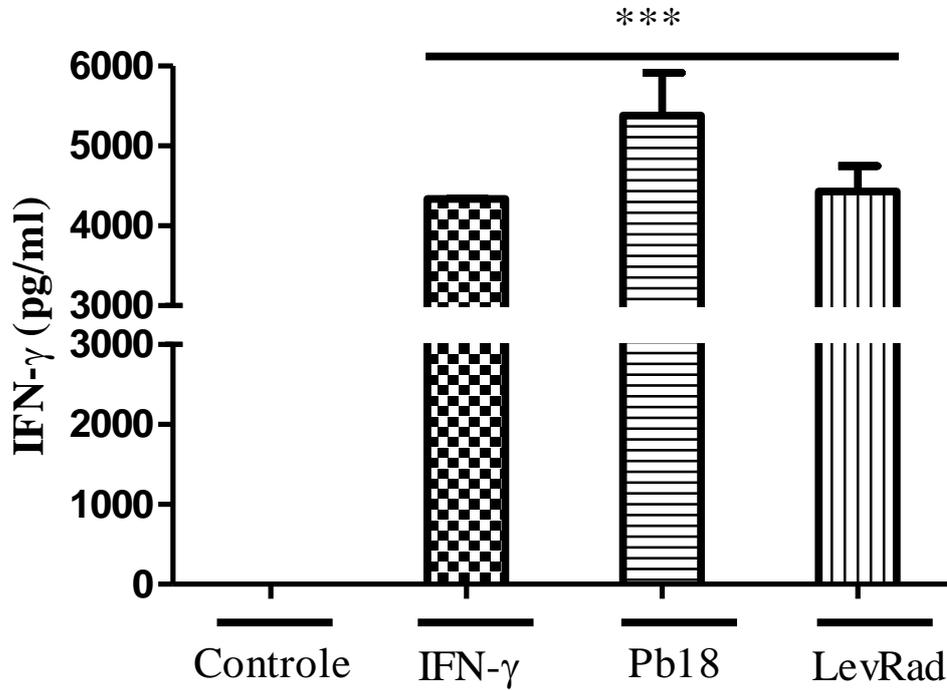
Não foram observadas diferenças significativas quanto aos níveis de IL-4 entre os sobrenadantes de cultura dos macrófagos pré-ativados ou não que foram cultivados na ausência ou presença de estímulo (IFN- $\gamma$ , Pb18 e LevRad) (Fig. 14).

FIGURA 10 - Nível de TNF- $\alpha$  presente no sobrenadante de cultura dos macrófagos pré-ativados com o IFN- $\gamma$  após estímulo com as células fúngicas de Pb18 e LevRad.



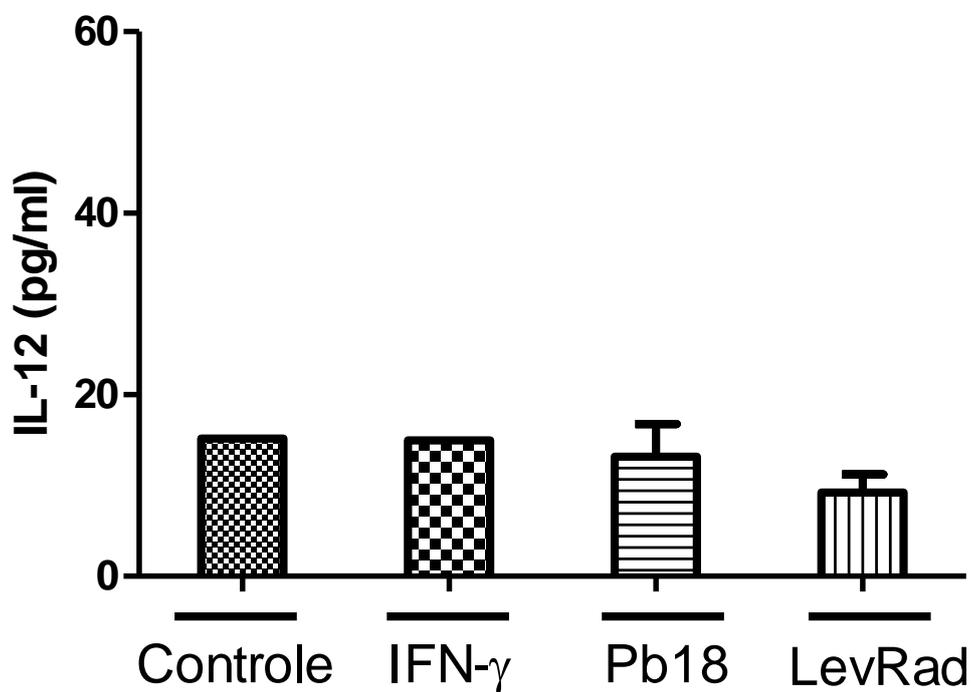
**Legenda:** Os macrófagos pré-ativados ( $5 \times 10^6$  células/poço) foram cultivados em meio RPMI-C por 24h na ausência ou presença de estímulo. Macrófagos não ativados cultivados em meio sem estímulo foram utilizados como controle. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos em triplicata de 2 experimentos representativos. \*\*\* Significativamente diferente quando comparado aos macrófagos ativados (IFN- $\gamma$ ) ou não (meio), cultivados na ausência de estímulo antigênico ( $p < 0.001$ ).

FIGURA 11 - Nível de IFN- $\gamma$  presente no sobrenadante de cultura dos macrófagos pré-ativados com o IFN- $\gamma$  após estímulo com as células fúngicas de Pb18 e LevRad.



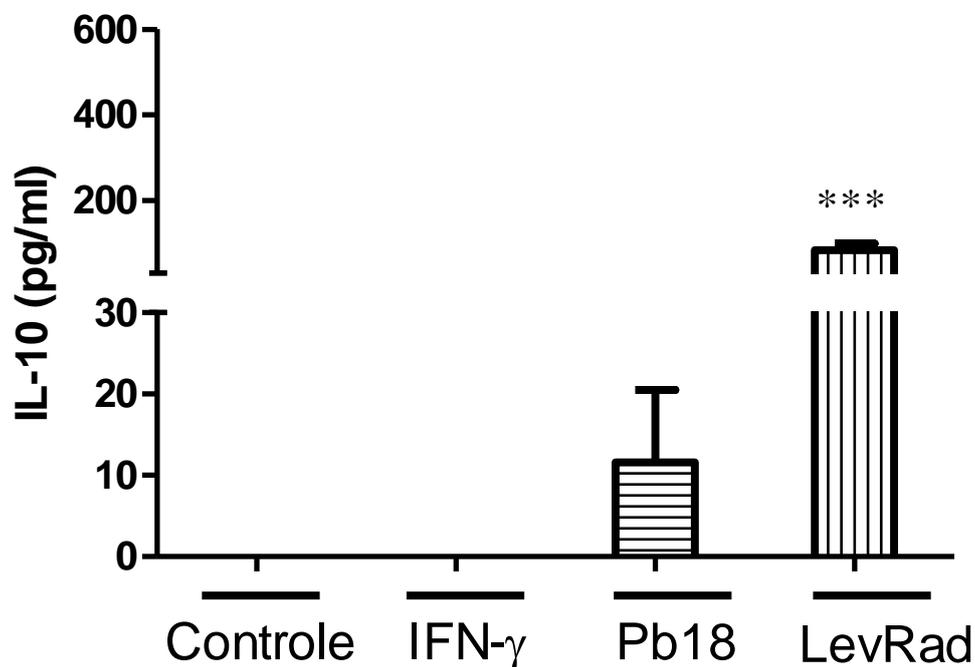
**Legenda:** Os macrófagos pré-ativados ( $5 \times 10^6$  células/poço) foram cultivados em meio RPMI-C por 24h na ausência ou presença de estímulo. Macrófagos não ativados cultivados em meio sem estímulo foram utilizados como controle. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos em triplicata de 2 experimentos representativos. \*\*\* Significativamente diferente quando comparado aos macrófagos não ativados cultivados na ausência de estímulo antigênico ( $p < 0.001$ ).

FIGURA 12 - Nível de IL-12 presente no sobrenadante de cultura dos macrófagos pré-ativados com o IFN- $\gamma$  após estímulo com as células fúngicas de Pb18 e LevRad.



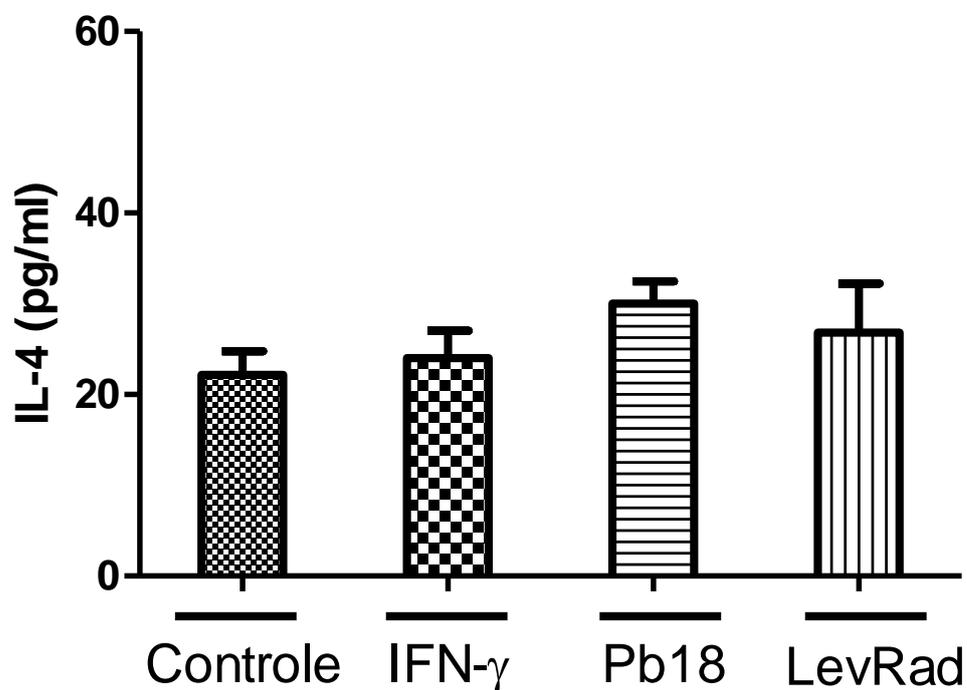
**Legenda:** Os macrófagos pré-ativados ( $5 \times 10^6$  células/poço) foram cultivados em meio RPMI-C por 24h na ausência ou presença de estímulo. Macrófagos não ativados cultivados em meio sem estímulo foram utilizados como controle. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos em triplicata de 2 experimentos representativos. Não foram considerados significativos os níveis de IL-12 produzidos entre os macrófagos pré-ativados estimulados em cultura ou aos não ativados cultivados sem qualquer estímulo.

FIGURA 13 - Nível de IL-10 presente no sobrenadante de cultura dos macrófagos pré-ativados com o IFN- $\gamma$  após estímulo com as células fúngicas de Pb18 e LevRad.



**Legenda:** Os macrófagos pré-ativados ( $5 \times 10^6$  células/poço) foram cultivados em meio RPMI completo por 24h na ausência ou presença de estímulo. Macrófagos não ativados cultivados em meio sem estímulo foram utilizados como controle. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos em triplicata de 2 experimentos representativos. \*\*\* Significativamente diferente quando comparado aos macrófagos pré-ativados (IFN- $\gamma$ ) ou não (meio), cultivados na ausência de estímulo ( $p < 0.001$ ). \*\* Significativamente diferente em relação ao fungo não irradiado ( $p < 0.01$ ).

FIGURA 14 - Nível de IL-4 presente no sobrenadante de cultura dos macrófagos pré-ativados com o IFN- $\gamma$  após estímulo com as células fúngicas de Pb18 e LevRad.



**Legenda:** Os macrófagos pré-ativados ( $5 \times 10^6$  células/poço) foram cultivados em meio RPMI completo por 24h na ausência ou presença de estímulo. Macrófagos não ativados cultivados em meio sem estímulo foram utilizados como controle. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos em triplicata de 2 experimentos representativos. Não foram considerados significativos os níveis de IL-4 produzidos entre os macrófagos pré-ativados estimulados em cultura ou aos não ativados cultivados sem qualquer estímulo.

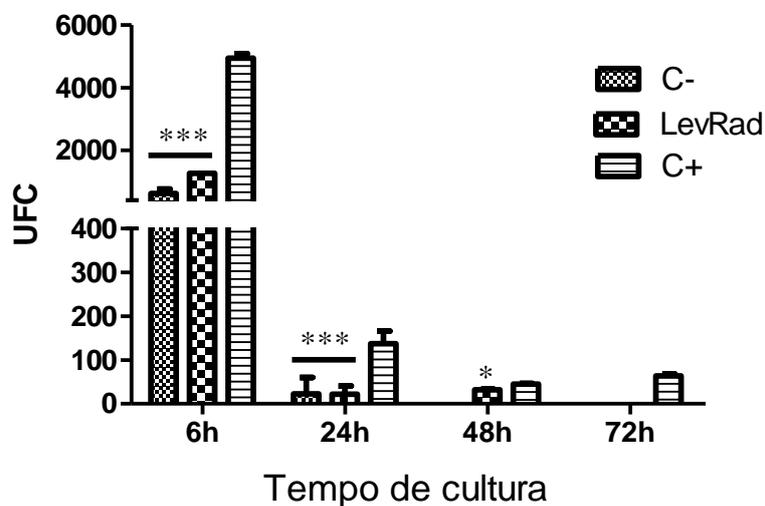
#### 5.2.4 Capacidade fungicida de macrófagos peritoneais desafiados *in vitro* com a LevRad

A capacidade fungicida de macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos grupos C-, C+ e LevRad foi verificada a partir das UFC recuperadas do lisado das culturas de macrófagos, previamente ativadas com o IFN- $\gamma$ , cultivado em estufa BOD a 37 °C, por aproximadamente 20 a 30 dias após o estímulo *in vitro* com as células fúngicas não irradiadas (Pb18).

Os resultados mostram a diminuição significativa, ao longo do tempo, das UFC recuperadas a partir do lisado das culturas de macrófagos peritoneais, obtidos dos animais dos grupos LevRad e C-, que foram pré-ativadas e estimuladas *in vitro* com o Pb18, em relação as UFC recuperadas do grupo C+ ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ). (Fig. 15).

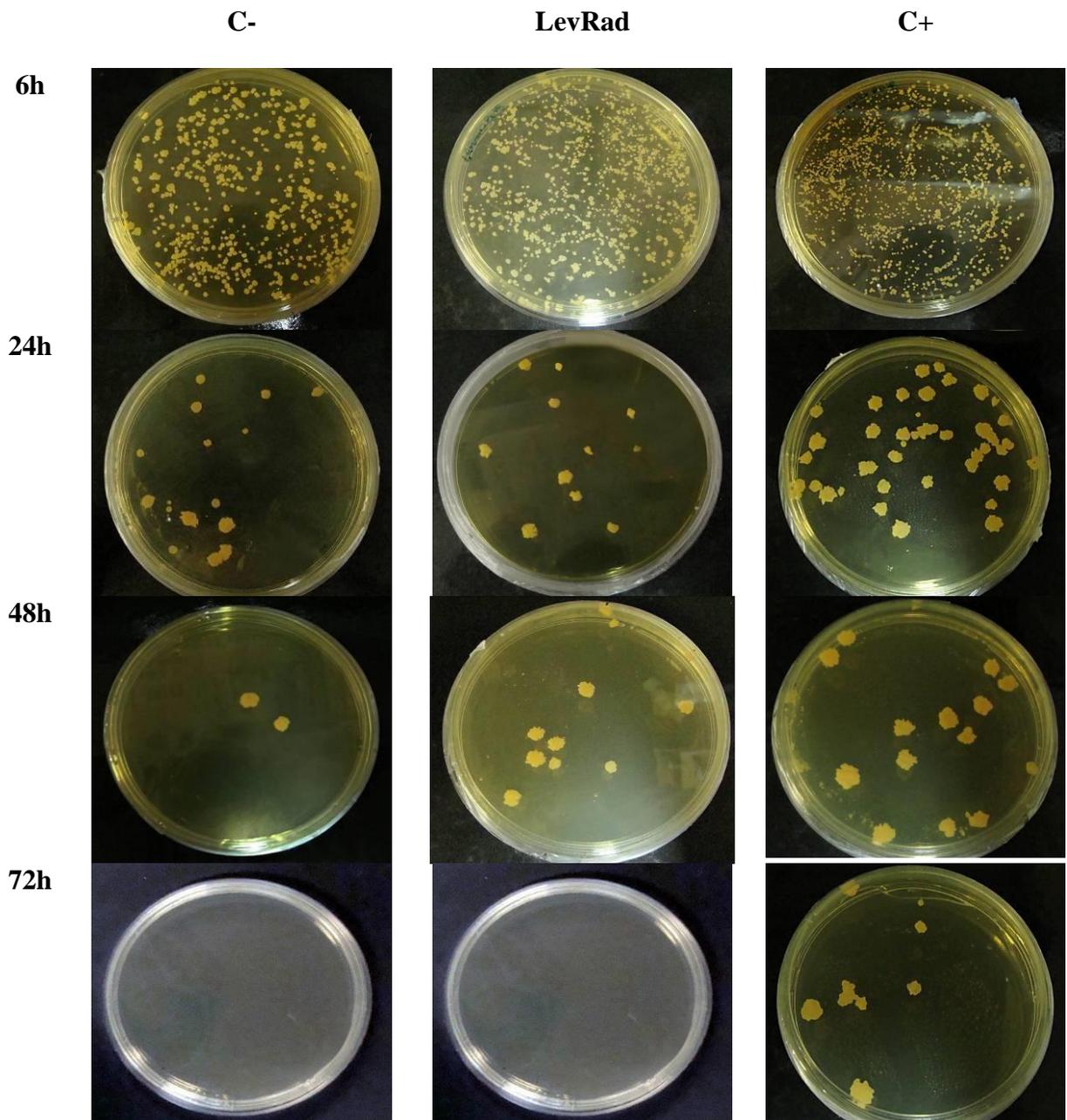
A figura 16 mostra as placas de meio BHI-ágar suplementado contendo colônias fúngicas de coloração creme e aspecto cerebriforme, compatíveis ao *P. brasiliensis*, recuperadas 6, 24, 48 e 72h após obtenção do lisado de macrófagos pré-ativados, estimulados com o Pb18.

FIGURA 15 - Determinação das UFC no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais pré-ativados com o IFN- $\gamma$  e estimulados *in vitro* com as células viáveis de *P. brasiliensis* não irradiado (Pb18).



**Legenda:** Os macrófagos obtidos de animais previamente imunizados (LevRad), que não sofreram qualquer intervenção (C-) ou infectados com o Pb18 não irradiado (C+) foram ativados e estimulados em cultura por 6, 24, 48 e 72h. Os resultados representam o número de colônias obtidas após o crescimento, com base na média da triplicata de 2 experimentos representativos. \*\*\* e \* representa a diferença significativa em relação às UFCs recuperadas do C+ ( $p < 0.001$ ).

FIGURA 16 - Imagens representativas das colônias de *P. brasiliensis* recuperadas do lisado dos macrófagos peritoneais.



**Legenda:** Os macrófagos obtidos de animais previamente imunizados (LevRad), que não sofreram qualquer intervenção (C-) ou infectados com o Pb18 não irradiado (C+) foram ativados e estimulados em cultura por 6, 24, 48 e 72h a 37°C.

### 5.2.5 Sumário dos Resultados

Os resultados obtidos mostram que a LevRad foi capaz de estimular *in vitro* a fagocitose, a secreção de altos níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 e a produção de NO. A eficiência na eliminação do fungo foi observada em macrófagos obtidos de camundongos imunizados, desafiados em cultura com o Pb18. A imunização com a LevRad parece ter favorecido a ativação dos macrófagos peritoneais pela ação TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e, conseqüente, eliminação fúngica dependente de NO.

### 5.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROFILÁTICO DA LevRad EM PCM EXPERIMENTAL

Neste experimento a atividade protetora desencadeada pela imunização com a LevRad foi avaliada a partir da determinação de UFCs e análise histopatológica dos órgãos dos animais imunizados. Ensaios para avaliar a proliferação das células do baço, bem como, para determinar o perfil de anticorpos e citocinas produzidos foram realizados para caracterizar o tipo de resposta imune induzida. Foram avaliadas as vias de imunização subcutânea e endovenosa.

#### 5.3.1 Determinação das UFCs

A avaliação do efeito protetor conferido pela imunização com a LevRad foi inicialmente investigada em camundongos machos BALB/c, a partir da contagem de UFCs por grama de tecido dos animais, 30 e 90 dias após a infecção desafio (i.t.) com o *P. brasiliensis* virulento não irradiado. Os dados obtidos foram plotados e expressos em  $\text{Log}_{10}$  da média das UFCs por grama de tecidos dos animais. Os animais infectados com o fungo não irradiado foram utilizados como controle (C+). Animais que não sofreram intervenção foram utilizados como o controle negativo (C-).

Não foram detectados UFCs em nenhum dos órgãos (pulmão, fígado e baço) dos animais imunizados três vezes consecutivas, pela via subcutânea, analisados 30 e 90 dias após a infecção desafio com o fungo virulento não irradiado (Sub3x) (Fig. 17A-B).

Os pulmões dos animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa (End3x), analisados 30 dias após infecção desafio, apresentaram diminuição significativa quanto ao número de UFCs em relação ao C+ ( $p < 0,001$ ) (Fig. 17A). Não foram detectadas colônias fúngicas nos demais órgãos (baço e fígado) e, nem nos órgãos (pulmão, baço e fígado) analisados 90 dias após o desafio (Fig. 17B).

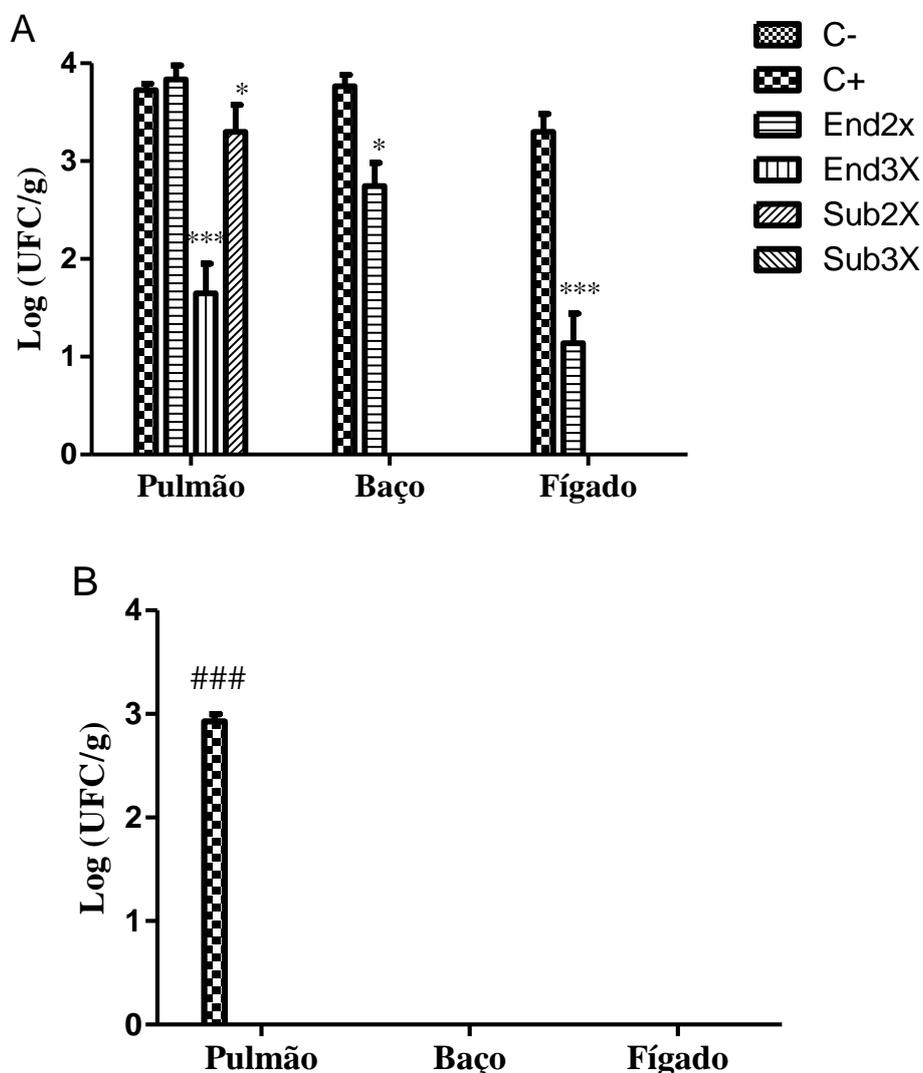
Não foram observadas diferenças significativas quanto ao número de UFCs determinadas nos pulmões dos animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa (End2x), analisados 30 dias após a infecção desafio, em relação ao C+. Todavia, houve diminuição significativa de UFCs no fígado e baço desses animais ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) (Fig. 17A).

O número de UFCs determinadas no pulmão dos animais do subgrupo Sub2x, analisado 30 dias após o desafio, foi considerado significativo em relação ao C+

( $p < 0,05$ ). Não foram observadas colônias fúngicas nos demais órgãos analisados (baço e fígado) (Fig. 17A).

Após 90 dias, apenas os pulmões dos animais do grupo C+ apresentaram quantidades significativas de colônias fúngicas em relação à LevRad\* ( $p < 0,001$ ). Os animais imunizados que haviam apresentado doença pulmonar focal (Sub2x, End3x) e, até mesmo, os animais imunizados que apresentaram doença branda disseminada (End2x) foram capazes de controlar efetivamente a PCM experimental (Fig. 17B).

FIGURA 17 - Determinação de UFCs nos órgãos (pulmão, baço e fígado) dos camundongos BALB/c imunizados via endovenosa ou subcutânea, duas ou três vezes consecutivas, com a LevRad.



**Legenda:** Os animais foram desafiados i.t. com o fungo não irradiado 30 dias após a imunização. Todos os animais foram submetidos à eutanásia 30 (A) e 90 (B) dias após a infecção desafio. **C-** - grupo dos animais que não sofreram intervenção; **C+** - grupo dos animais infectados, pela via intratraqueal, com  $3 \times 10^5$  células de *P. brasiliensis* não irradiado; **End2x** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3x** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **Sub3x** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. Os dados obtidos foram expressos em  $\text{Log}_{10}$  da média  $\pm$  o desvio padrão das UFCs por grama de tecidos dos animais em cada grupo experimental ( $n=5$ ). \*\*\*e \* representa diferença significativa em relação ao controle positivo ( $p < 0.001$  e  $p < 0.05$ ); ### representa diferença significativa em relação ao C- e aos grupos imunizados e ( $p < 0.001$ ).

### 5.3.2 Análise histopatológica dos órgãos dos animais imunizados

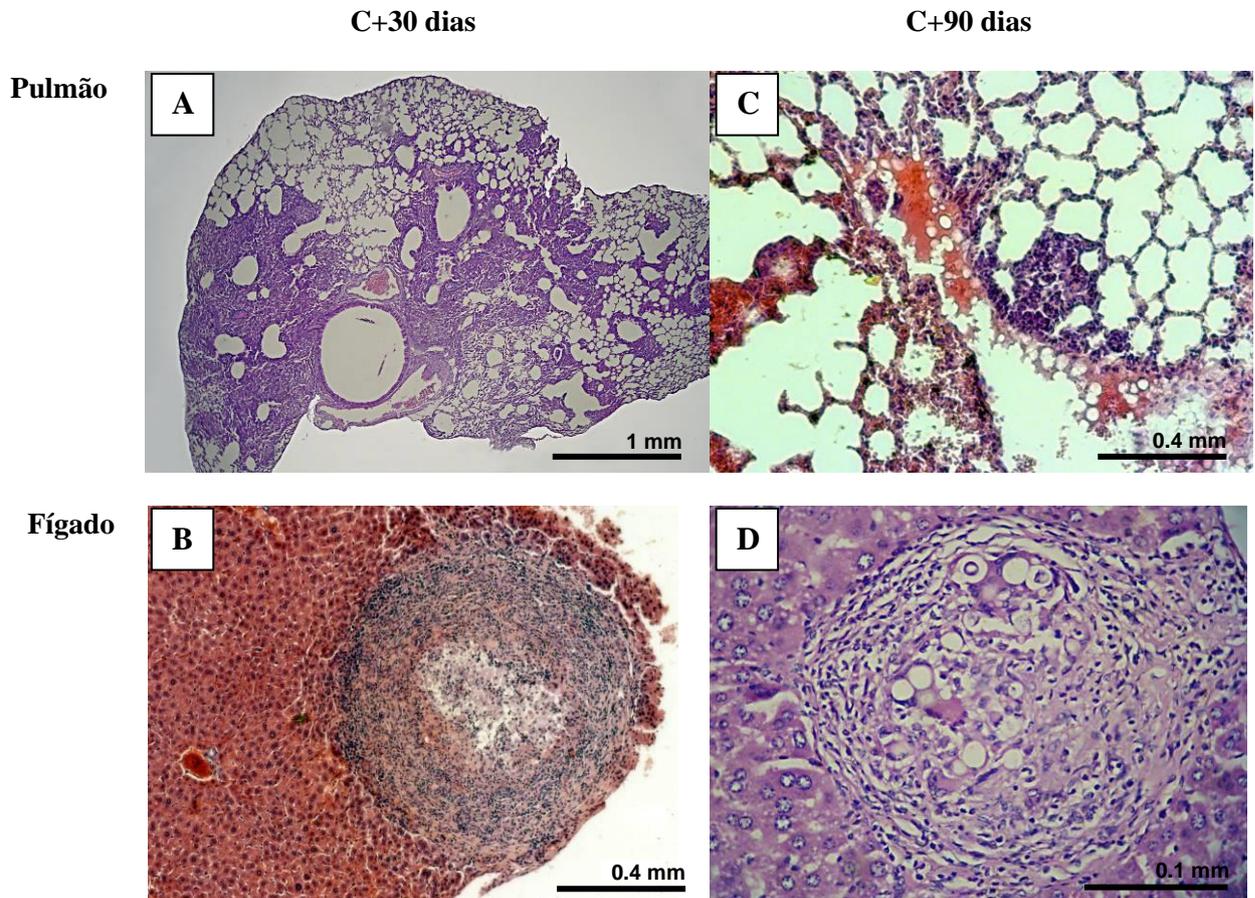
A figura 19 representa os cortes histológicos dos órgãos (pulmão, baço e fígado) removidos dos animais imunizados com a LevRad e desafiados com *P. brasiliensis* não irradiado. Esses cortes histológicos foram analisados 30 e 90 dias após a infecção desafio e comparados com os dos animais que não sofreram qualquer tipo de intervenção (C-) e animais infectados com o *P. brasiliensis* não irradiados (C+).

Não foram observadas alterações histopatológicas em nenhum dos órgãos (pulmão, baço e fígado) dos animais imunizados dos grupos Sub2X, End2x e End3x (Fig. 19A-F), analisados 30 e 90 dias após desafio, quando comparados aos órgãos dos animais C- (Fig. 19I-J) e C+ (Fig. 18). Apenas em um dos cinco pulmões analisados dentro do subgrupo dos animais imunizados, Sub3X, foi observada uma área de necrose extensa constituída por infiltrado linfocitário e neutrofilico circundado por tecido conjuntivo fibroso, além de alguns pontos de mineralização (Fig 19H).

No pulmão dos animais infectados com o fungo não irradiado (C+), analisados 30 dias após infecção, houve o desenvolvimento de pneumonia intersticial piogranulomatosa intensa, multifocal a coalescente, associada a estruturas fúngicas intralesionais com paredes birrefringentes variando de 15 a 25µm, compatíveis ao *P. brasiliensis*. O infiltrado inflamatório foi constituído por linfócitos, macrófagos, plasmócitos, neutrófilos e células gigantes do tipo Langehans (Fig. 18A). O fígado apresentou lesões granulomatosas multifocal, leve a moderado, circundado por tecido conjuntivo fibroso constituído por linfócitos e células fúngicas no interior (Fig. 18B). Não houve alteração histopatológica no baço destes camundongos (dados não mostrados).

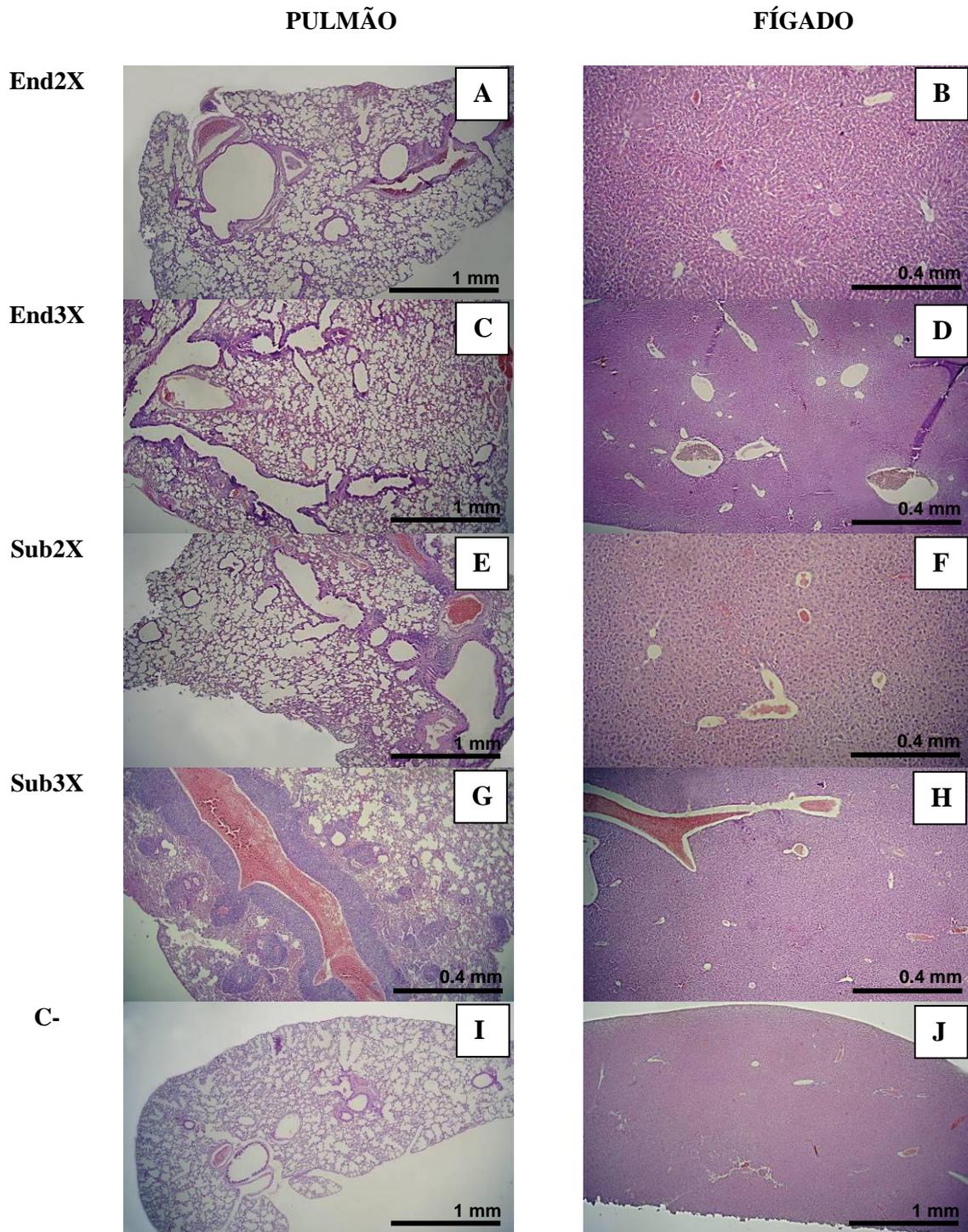
Após 90 dias, a lesão pulmonar dos animais infectados regrediu a focos inflamatórios perivascular e intersticiais não granulomatoso linfocitário multifocal discreto (Fig.18C). Os fígados dos animais infectados apresentaram granulomas médios multifocais aleatórios em discreta quantidade circundados por tecido conjuntivo fibroso contendo estruturas compatíveis ao *P. brasiliensis* em seu interior (Fig.19D). Não houve alterações significativas às observadas no baço desses animais (Dados não mostrados).

FIGURA 18 - Histopatologia representativa dos órgãos (pulmão e fígado) dos camundongos BALB/c analisados 30 e 90 dias após o desafio com o *P. brasiliensis* não irradiado.



**Legenda:** **Em A** = Lesão granulomatosa multifocal a coalescente; **Em B** = fígado contendo granuloma organizado com células fúngicas no interior. **Em C** = pulmão com infiltrado inflamatório sem estruturas fúngicas visíveis; **Em D** = fígado contendo granuloma organizado com células fúngicas viáveis no seu interior. A barra preta indica a escala da foto. Coloração por HE.

FIGURA 19 - Histopatologia representativa dos órgãos (pulmão e fígado) dos camundongos BALB/c imunizados com a LevRad.



**Legenda:** Todos os animais foram desafiados com o *P. brasiliensis* não irradiado 30 dias após a imunização. O grupo dos animais que não sofreram qualquer intervenção foi utilizado como o controle negativo (C-). **End2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via

---

subcutânea; **Sub3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. Não foram observadas alterações histopatológicas nos órgãos analisados após a infecção desafio (LevRad\*) e nem nos grupos C- (A-F e H-J); **Em G** – área de necrose extensa. Coloração por HE.

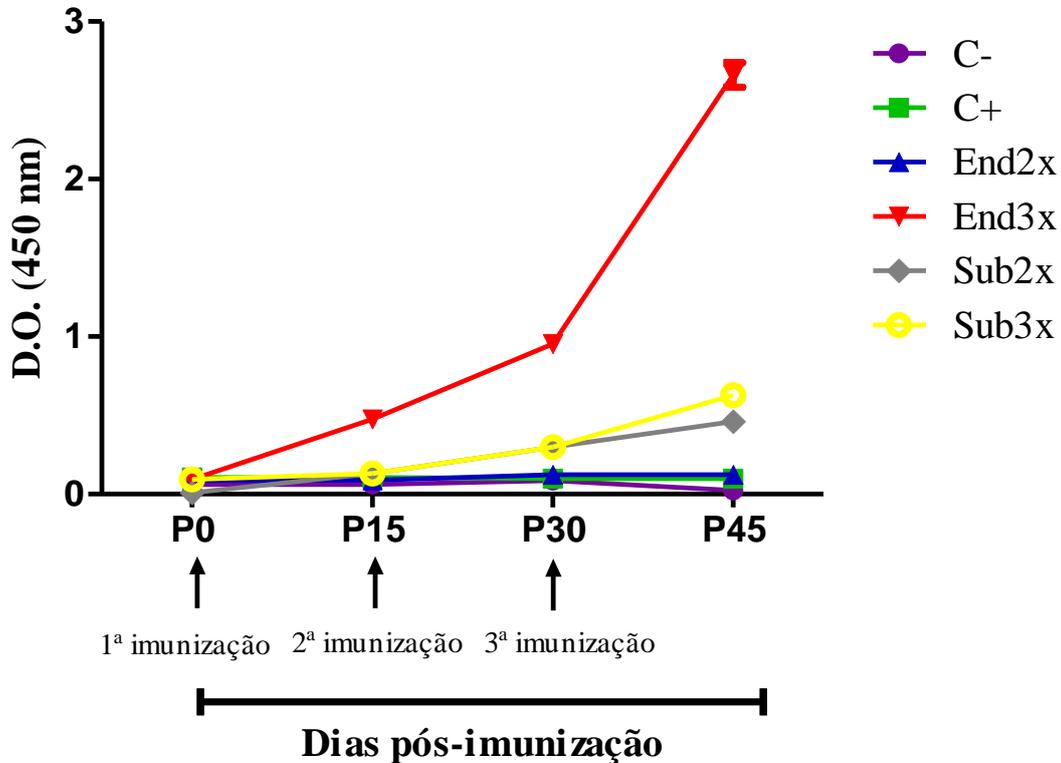
### 5.3.3 Reatividade de IgG anti-Mexo nos soros dos camundongos imunizados

Os soros dos camundongos coletados antes (P0) e 15 (P15), 30 (P30) e 45 (P45) dias após a primeira imunização com a LevRad foram testados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para avaliação da produção de anticorpos IgG específicos anti-Mexo. Soros de animais que não sofreram qualquer intervenção foram utilizados como controle negativo (C-). Os resultados expressos em densidade óptica a 450 nm representam a média  $\pm$  o desvio padrão da triplicata das reações de um pool de soros de camundongos por grupo.

Os resultados na figura 20 mostram a produção significativa de anticorpos IgG anti-Mexo quinze dias após a primeira imunização, nos soros dos animais imunizados 3 vezes consecutivas com a LevRad pela via endovenosa (End3X) e após 30 dias no soro dos animais imunizados duas ou três vezes pela via subcutânea (Sub2X e Sub3X). Os animais dos grupos C- e C+ não apresentaram níveis significativos de anticorpos IgG frente ao antígeno Mexo.

Esses resultados mostram que a imunização com a LevRad foi capaz de estimular a produção de anticorpos frente ao antígeno de fungo, principalmente em animais imunizados três vezes (End3x).

FIGURA 20 - Detecção de anticorpos anti-Mexo em camundongos BALB/c imunizados com a LevRad e desafiados.



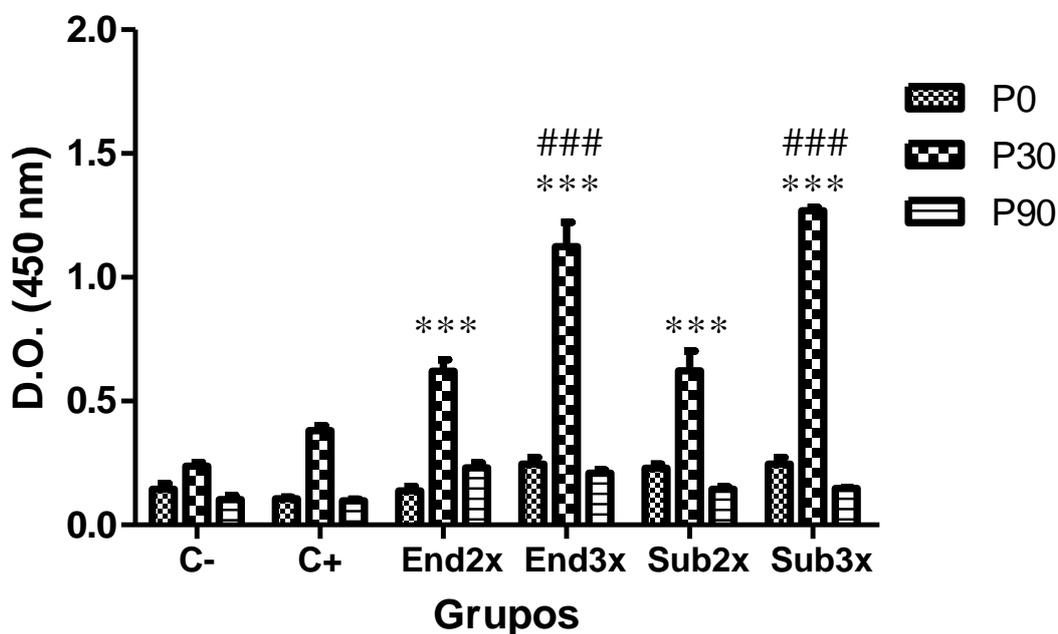
**Legenda:** Os soros dos camundongos foram testados por ELISA, diluição 1:100, quanto a presença de IgG anti-Mexo antes (P0) e 15 (P15), 30 (P30) e 45 (P45) dias após a primeira imunização. C- - grupo dos animais que não sofreram intervenção; C+ - grupo dos animais infectados, pela via intratraqueal, com  $3 \times 10^5$  células de *P. brasiliensis* não irradiado; End2X - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; End3X - animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; Sub2X - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; Sub3X - animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. Os resultados expressos em densidade óptica a 450 nm representam a média  $\pm$  o desvio padrão da triplicata das reações de um pool de soros de camundongos por grupo. Para o ensaio foi utilizado 0,5  $\mu$ g/poço do Mexo. Experimento realizado com n=5.

#### 5.3.4 Produção de anticorpos IgG anti-Mexo nos soros dos camundongos imunizados e desafiados

Os camundongos imunizados duas ou três vezes consecutivas com a LevRad foram submetidos ao desafio com *P. brasiliensis* virulento não irradiado 30 dias após a imunização (LevRad\*). Os soros obtidos 30 e 90 dias após o desafio foram utilizados em ensaios de ELISA na diluição de 1:100. Soros de animais que não sofreram qualquer intervenção foram utilizados como controle negativo (C-) e soros obtidos de animais infectados com o fungo não irradiado foram utilizados como controle positivo (C+). Os resultados expressos em densidade óptica a 450 nm representam a média  $\pm$  desvio padrão da triplicata das reações de um pool de soros de camundongos por grupo.

Os resultados na figura 21 mostram a produção elevada de anticorpos IgG total anti-Mexo nos soros dos animais dos subgrupos Sub2X, Sub3X, End2X e End3X analisados 30 dias após o desafio. Esse aumento foi significativo em relação ao C- e C+ ( $p < 0,001$ ). A produção de IgG total nos soros dos animais imunizados três vezes consecutivas (Sub3X e End3X) foi significativa em relação aos níveis detectados nos animais imunizados duas vezes (Sub2X e End2X) ( $p < 0,001$ ). Após 90 dias, houve diminuição significativa dos níveis de IgG total nos soros de todos os subgrupos dos animais imunizados (Sub2X, Sub3X, End2X e End3X) em relação ao ponto de 30 dias ( $p < 0,001$ ).

FIGURA 21 - Perfil de IgG anti-Mexo nos soros dos camundongos BALB/c imunizados com LevRad e desafiados.



**Legenda:** Os soros dos camundongos imunizados coletados antes (P0) e 30 P(30) e 90 P(90) dias após o desafio foram testados por ELISA, em diluição 1:100, quanto a presença de IgG anti-Mexo. C- - grupo dos animais que não sofreram intervenção; C+ - grupo dos animais infectados, pela via intratraqueal, com  $3 \times 10^5$  células de *P. brasiliensis* não irradiado; **End2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **Sub3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. Os resultados expressos em densidade óptica a 450 nm representam a média  $\pm$  o desvio padrão da triplicata das reações de um pool de soros de camundongos por grupo. Para o ensaio foi utilizado 0,5  $\mu$ g/poço do Mexo. Experimento realizado com n=5. \*\*\* representa diferença significativa em relação ao C- e C+ ( $p < 0.001$ ); ### representa diferença significativa em relação ao Sub2X e End2X ( $p < 0.001$ ).

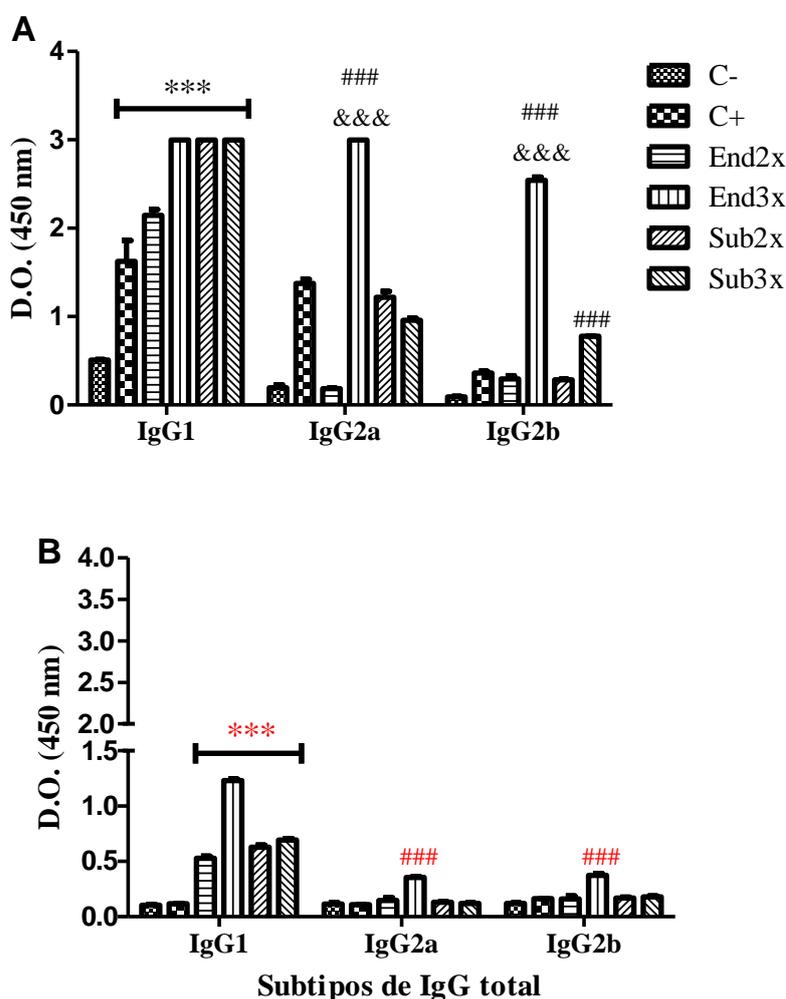
### 5.3.5 Determinação de IgG1, IgG2a e IgG2b anti-Mexo nos soros dos camundongos imunizados e desafiados

Ensaio de ELISA, diluição 1:100, foram realizados para determinar o perfil dos isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b anti-Mexo, nos soros dos camundongos imunizados duas ou três vezes consecutivas com a LevRad e, posteriormente, desafiados com *P. brasiliensis* virulento não irradiado 30 dias após a imunização (LevRad\*). Todos os soros foram coletados 30 e 90 dias após o desafio. Soros de animais que não sofreram qualquer intervenção foram utilizados como controle negativo (C-) e os soros obtidos de animais infectados com o fungo virulento não irradiado foram utilizados como controle positivo (C+). Os resultados expressos em densidade óptica a 450 nm representam a média  $\pm$  o desvio padrão da triplicata das reações de um pool de soros de camundongos por grupo.

Os resultados observados na figura 22 mostram a produção significativa de IgG1 anti-Mexo nos soros dos animais do grupo C+ e dos subgrupos (Sub2X, Sub3X, End2X e End3X), analisados 90 dias após o desafio, em relação ao C- e aos demais isotipos (IgG2a e IgG2b) ( $p < 0.001$ ). Os níveis de IgG1 só não foram superiores aos dos isotipos IgG2a e IgG2b detectados nos soros dos animais End3X. Além disso, foi observado a produção significativa de IgG2a e IgG2b nos soros dos animais do subgrupo End3X, em relação ao C-, C+ e aos demais subgrupos de animais imunizados (Sub2X, Sub3X, End2X). Os níveis de IgG2b em Sub3x também foram significativos em relação ao C+ ( $p < 0.001$ ).

Após 90 dias, houve diminuição dos títulos de anticorpos (IgG1, IgG2a e IgG2b) em todos os grupos e subgrupos que haviam apresentado esses isotipos aumentados. Apesar disso, os níveis de IgG1 permaneceram significativamente aumentados nos subgrupos dos animais imunizados (Sub2X, Sub3X, End2X e End3X) quando comparados aos grupos C- e C+ e aos demais subtipos (IgG2a e IgG2b) ( $p < 0.001$ ). Os níveis de IgG2a permaneceram significativos em End3X em relação aos grupos C- e C+, e aos subgrupos Sub2X, Sub3X, End2X e End3X.

FIGURA 22 - Perfil de IgG1, IgG2a e IgG2b anti-Mexo nos soros dos camundongos BALB/c imunizados com a LevRad e desafiados.



**Legenda:** Os soros dos camundongos imunizados coletados 30 (A) e 90 (B) dias após o desafio foram testados por ELISA, em diluição 1:100, quanto a presença de IgG anti-Mexo. **C-** - grupo dos animais que não sofreram intervenção; **C+** - grupo dos animais infectados, pela via intratraqueal, com  $3 \times 10^5$  células de *P. brasiliensis* não irradiado; **End2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **Sub3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. Os resultados expressos em densidade óptica a 450 nm representam a média e o desvio padrão da triplicata das reações de um pool de soros de camundongos por grupo. Para o ensaio foi utilizado 0,5 µg/poço do Mexo. Experimento realizado com n=5. \*\*\* representa diferença significativa em relação ao C- e aos demais subtipos de IgG ( $p < 0.001$ ); ### representa diferença significativa em relação ao C-, C+ , Sub2X, Sub3X e End2X ( $p < 0.001$ ); &&& representa diferença significativa em relação ao C+ ( $p < 0.001$ ); \*\*\* representa diferença significativa em relação ao C-, C+ e aos demais subtipos de IgG ( $p < 0.001$ ); ### representa diferença significativa em relação ao demais grupos ( $p < 0.001$ ).

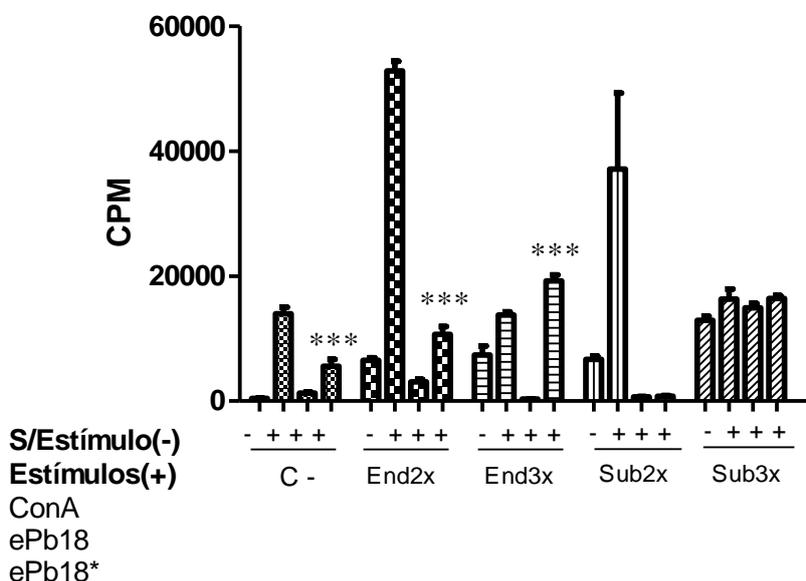
### 5.3.6 Efeito da LevRad na proliferação celular

Para avaliar o efeito da LevRad na proliferação celular, esplenócitos extraídos dos camundongos BALB/c apenas imunizados com a LevRad (LevRad) ou imunizados e desafiados com as células leveduriformes de *P. brasiliensis* não irradiado (LevRad\*) foram mantidos em cultura na ausência ou na presença dos estímulos antigênicos (Pb18, Pb18\* ou ConA). As células do baço de animais que não sofreram qualquer tipo de intervenção (C-) e infectados com o *P. brasiliensis* não irradiado (C+) foram utilizadas como controle do experimento. As culturas de células cultivadas em meio RPMI-C sem estímulo ou estimuladas com o ConA foram utilizadas como controle de proliferação. A proliferação celular foi avaliada a partir da incorporação da <sup>3</sup>H-timidina. Os resultados foram expressos como a média de triplicatas da contagem por min (cpm).

A Figura 23 mostra a proliferação dos esplenócitos, obtidos 15 dias após a imunização dos camundongos (levRad), frente ao estímulo *in vitro* com os antígenos de *P. brasiliensis* (ePb18 e ePb18\*), através da técnica de incorporação da <sup>3</sup>H-timidina. Os resultados obtidos revelaram que o ePb18\* foi capaz de estimular significativamente a proliferação das células dos animais que não sofreram qualquer intervenção (C-) e, dos animais imunizados duas ou três vezes consecutivas, pela via endovenosa (End2x e End3x), em relação às células cultivadas no meio sem estímulo ( $p < 0,001$ ). O subgrupo End3x apresentou, ainda, proliferação significativa em relação ao C-, End2X e Sub2x ( $p < 0,001$ ).

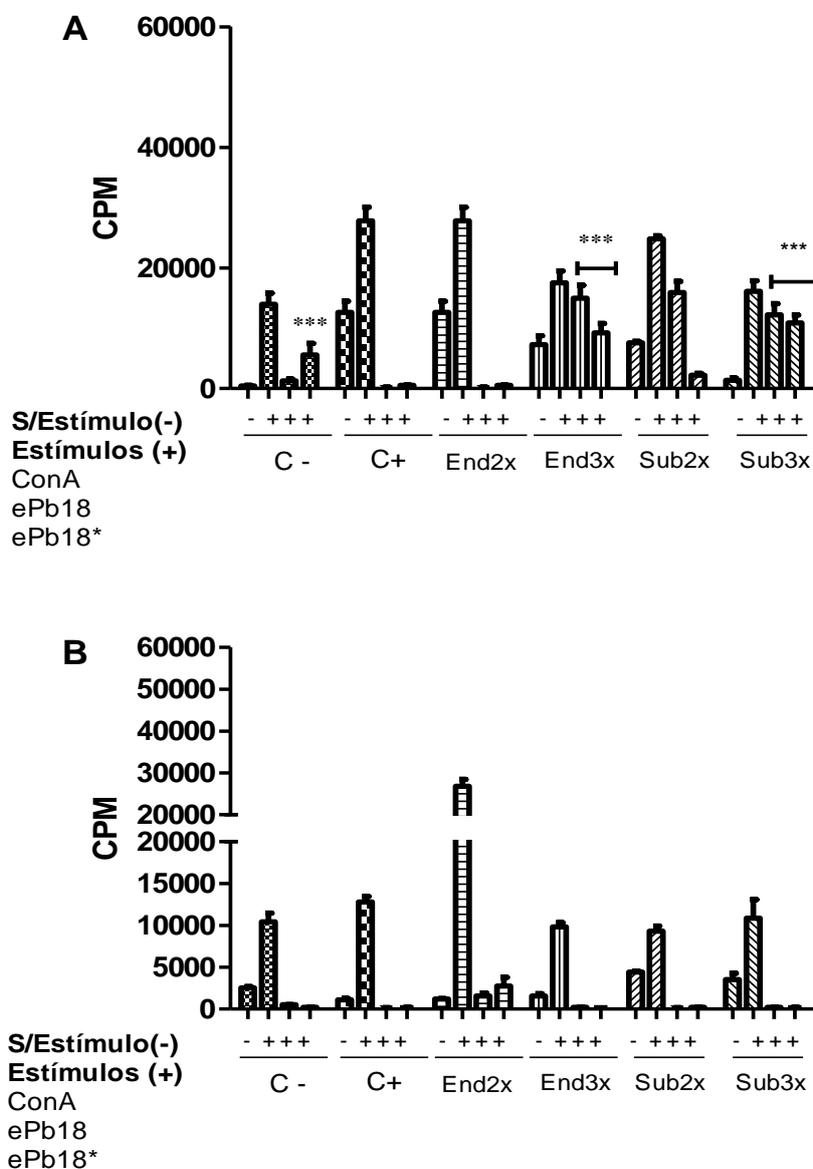
A proliferação dos esplenócitos, obtidos dos animais imunizados duas ou três vezes consecutivas pela via endovenosa (End2X, End3X) ou subcutânea (Sub3X), também foi analisada 30 e 90 dias após a infecção desafio. Após 30 dias, houve proliferação significativas das células dos animais do grupo C-, estimuladas pelo ePb18\*, em relação ao meio sem estímulo ( $p < 0,001$ ). ePb18\* e ePb18 também estimularam significativamente a proliferação das células obtidas dos animais imunizados dos subgrupos End3x e Sub3x, em relação às células cultivadas no meio sem estímulo e, em relação ao C-, C+ e End2x ( $p < 0,001$ ) (Fig. 24A). Após 90 dias, não foi observado proliferação celular significativa, frente aos estímulos ePb18 e ePb18\*, em nenhum dos animais dos grupos C- e C+ e dos animais imunizados (Fig. 24B).

FIGURA 23 - Proliferação de esplenócitos induzida por antígenos de *P. brasiliensis* (ePb18 e ePb18\*).



**Legenda:** Cerca de  $1 \times 10^6$  células/poço, isoladas de animais C- e LevRad, 15 dias após a última imunização, foram cultivadas em placas de 96 poços sem estímulo antigênico ou com ConA (16 $\mu$ g/mL), Pb18 (25 $\mu$ g/mL) e Pb18\* (25 $\mu$ g/mL), por 96h, a 37°C e CO<sub>2</sub> 5%. Nas últimas 18h foi adicionado às placas [<sup>3</sup>H]-timidina 0.5 $\mu$ Ci. A incorporação de timidina radioativa foi medida por cintilação líquida. **C-** - grupo dos animais que não sofreram intervenção; **End2x**-animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3x**-animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2x**-animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **Sub3x**-animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. Os dados foram reportados como média das triplicatas de contagem por minuto (c.p.m.) ou  $\pm$  desvio padrão de 5 animais por grupo. \*\*\* representa diferença significativa em relação às células cultivadas no meio sem estímulo ( $p < 0.001$ ); ### representa diferença significativa em relação às células cultivadas no meio sem estímulo e, em relação ao C-, End2X e Sub2x ( $p < 0.001$ ).

FIGURA 24 - Proliferação de esplenócitos induzida por antígenos de *P. brasiliensis* (ePb18 e ePb18\*) analisada 30 (A) e 90 (B) dias após o desafio.



**Legenda:** Cerca de  $1 \times 10^6$  células/poço, isoladas de animais C-, C+, LevRad e LevRad\* desafio foram cultivadas em placas de 96 poços sem estímulo antigênico ou com ConA ( $16 \mu\text{g/mL}$ ), Pb18 ( $25 \mu\text{g/mL}$ ) e Pb18\* ( $25 \mu\text{g/mL}$ ), por 96 horas, a  $37^\circ\text{C}$  e  $\text{CO}_2$  5%. Nas últimas 18h foi adicionado às placas  $0.5 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-timidina. A incorporação de timidina radioativa foi medida por cintilação líquida. C- - grupo dos animais que não sofreram intervenção; C+ - grupo dos animais infectados, pela via intratraqueal, com  $3 \times 10^5$  células de *P. brasiliensis* não irradiado; **Sub3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea; **End3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa. Os dados foram reportados como média das triplicatas de contagem por minuto (c.p.m.)  $\pm$  desvio padrão de 5 animais por grupo. \*\*\* representa diferença significativa em relação às células cultivadas no meio sem estímulo e, em relação ao C-, C+ e End2x ( $p < 0.001$ ).

### 5.3.7 Níveis transcritos de citocinas e da enzima iNOS em camundongos infectados e tratados

Níveis transcritos de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$ ) e da enzima iNOS foram medidos, por PCR em tempo real, no pulmão dos camundongos apenas imunizados com a LevRad (LevRad) ou imunizados com a LevRad e, posteriormente, desafiados com o fungo virulento não irradiado (LevRad\*). Todos os pulmões foram coletados 15 dias após a última imunização ou 30 e 90 dias após o desafio. Os pulmões dos animais infectados com o fungo não irradiado foram utilizados como controle positivo (C+). Os pulmões dos animais que não sofreram qualquer intervenção (C-) foram utilizados para obtenção dos níveis basais de expressão das citocinas e da iNOS. O gene foi considerado diferencialmente expresso quando apresentou a expressão duas vezes aumentada em relação ao calibrador. Os resultados expressos indicam a quantificação relativa da expressão gênica normalizada em relação ao gene constitutivo ( $\beta$ -actina) em cada grupo analisado.

Os resultados mostram a expressão das citocinas no pulmão dos animais do subgrupo End2x, End3x, Sub2x e Sub3x, analisada 15 dias após a última imunização. Os resultados revelaram o aumento da expressão tanto de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ ) quanto de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) nos pulmões dos animais dos subgrupos End2x, End3x e Sub2x. Em End3x houve produção significativa de IFN- $\gamma$  em relação a IL-4 e IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em relação aos outros subgrupos de animais imunizados ( $p < 0,001$ ) (Fig. 25).

A figura 26 mostra a expressão significativa de IFN- $\gamma$  nos pulmões dos animais dos subgrupos Sub2X e Sub3X analisados 30 dias após o desafio, em relação ao C+, End3X e End2X ( $p < 0,001$  (Sub2x significativo em relação a C+, End3X e End2X);  $p < 0,001$  (Sub3X significativo em relação a C+);  $p < 0,05$  (Sub3X significativo em relação a End3X);  $p < 0,01$  (Sub3X significativo em relação a em relação a End2X)). Houve aumento da expressão de IFN- $\gamma$  nos pulmões dos animais dos subgrupos End3X e Sub3X analisados 90 dias após o desafio, em relação ao ponto de 30 dias. Sendo os níveis transcritos dessa citocina em End3x significativos em relação ao C+ e aos demais subgrupos analisados ( $p < 0,001$ ).

Os níveis transcritos de TNF- $\alpha$  apresentaram-se significativamente aumentados nos grupos C+ e nos demais subgrupos dos animais imunizados (End3X, Sub2X e Sub3X) analisados 90 dias após o desafio, em relação aos animais analisados no ponto

de 30 dias ( $p<0,001$ ). A expressão em End3X, Sub2X e Sub3X foi significativa em relação ao C+ ( $p<0,001$ ). A expressão em End3X e sub3X também foi significativa, em relação aos demais subgrupos de animais imunizados duas vezes consecutivas (End2X e Sub2X) ( $p<0,001$ ) (Fig. 27).

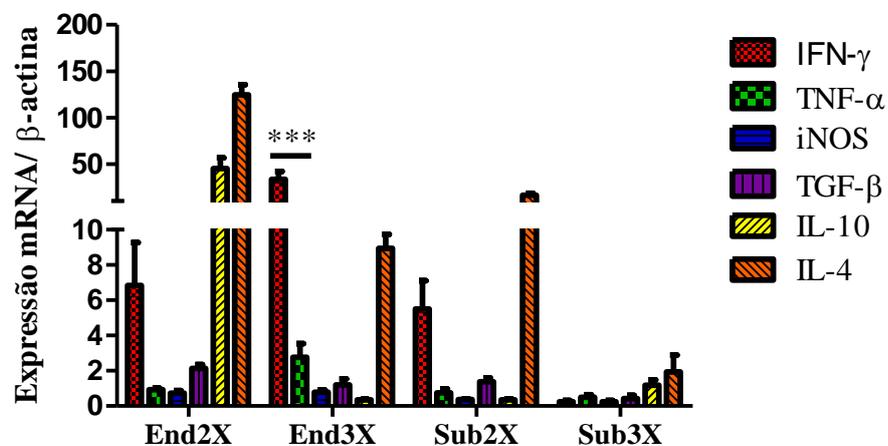
Houve aumento significativo da expressão de iNOS nos pulmões dos animais infectados (C+), bem como, nos subgrupos (Sub2X e Sub3X) analisados 90 dias após o desafio quando comparados aos analisados 30 dias depois ( $p<0,001$ ). A expressão no pulmão dos animais imunizados duas ou três vezes consecutivas pela via subcutânea (Sub2X e Sub3X) foi significativamente maior em relação aos animais imunizados duas ou três vezes pela via endovenosa (End2X e End3X) ( $p<0,001$ ), mas não em relação ao C+ (Fig. 28).

Com relação a IL-10, houve expressão significativa nos pulmões dos animais C+ e dos subgrupos End2X e Sub3X, analisados 30 dias após desafio, em relação aos analisados 90 dias depois (Fig. 5B) ( $p<0,001$ ). A expressão em C+ e Sub3X foi significativa em relação aos demais subgrupos analisados (End2X, End3X e Sub2X) ( $p<0,001$ ) (Fig. 29).

Níveis transcritos de TGF- $\beta$  apresentaram-se significativamente aumentados 90 dias após o desafio em C+, em relação a End2X, End3X, Sub2X e Sub3X ( $p<0,001$ ) (Fig. 30).

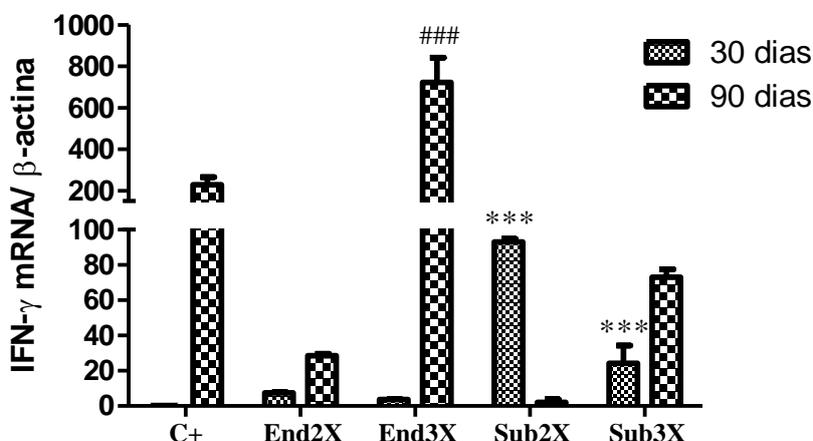
Por fim, os níveis transcritos de IL-4 apresentaram-se significativamente aumentados nos subgrupos End2X e Sub2X, analisados 30 dias após desafio, em relação ao C+, End3X e Sub3X. Após 90 dias, os níveis de IL-4 em End2X e Sub2X diminuíram enquanto houve aumento significativo da expressão em End3X e Sub3X, em relação ao C+ e aos demais subgrupos analisados ( $p<0,001$  e  $p<0,05$ , respectivamente) (Fig. 31).

FIGURA 25 - Expressão relativa de citocinas nos pulmões dos camundongos imunizados.



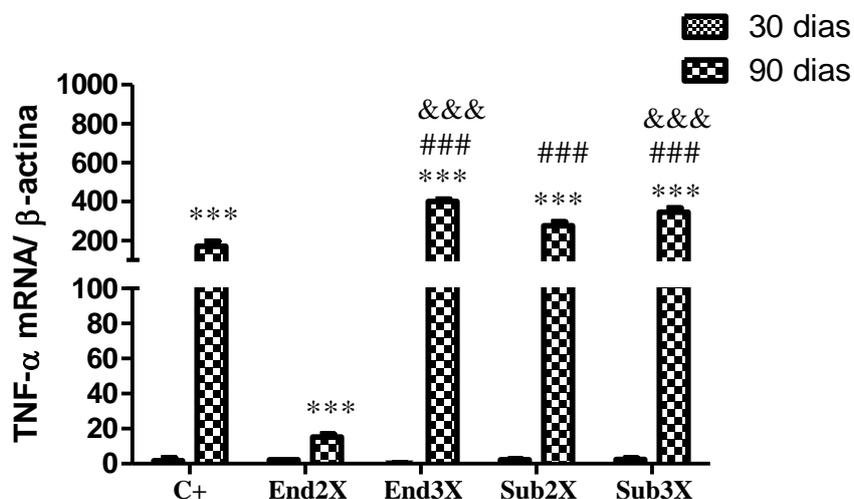
**Legenda:** Os animais imunizados com a LevRad foram submetidos à eutanásia 15 dias depois da última imunização. **End2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **Sub3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica das diferentes citocinas nos pulmões dos animais de cada grupo (n=5 animais) normalizada em relação à  $\beta$  - actina . Foi considerado um aumento de duas vezes como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-). \*\*\* Significativamente diferente quando comparado ao C+ e aos demais subgrupos (End2x, Sub2x e Sub3x).

FIGURA 26 - Expressão relativa de IFN- $\gamma$  nos pulmões dos camundongos imunizados e desafiados.



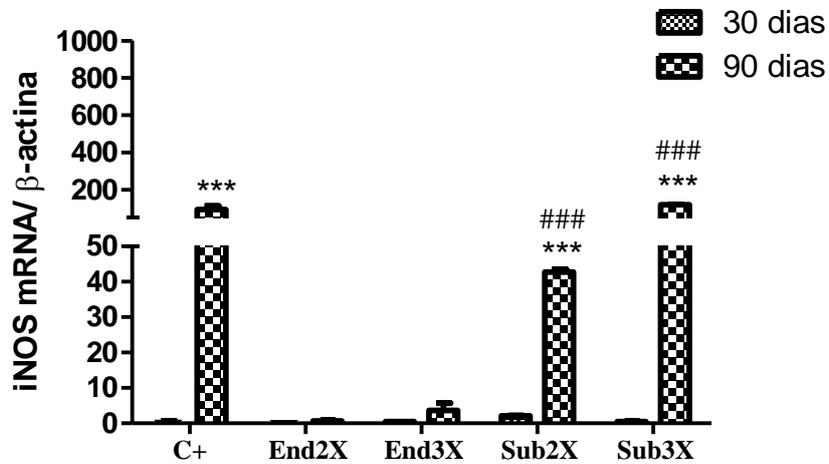
**Legenda:** Os animais imunizados com a LevRad foram desafiados com o fungo virulento não irradiado 30 dias após a última imunização e submetidos à eutanásia 30 e 90 dias após o desafio. **C+** - animais infectados; **End2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **Sub3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica nos pulmões dos animais de cada grupo (n=5 animais) normalizada em relação à  $\beta$  - actina. Foi considerado um aumento de duas vezes como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-). \*\*\* Significativamente diferente quando comparado ao C+, End3X e End2X; \* Significativamente diferente quando comparado ao End2x; \*\* Significativamente diferente quando comparado ao End3X; ### Significativamente diferente quando comparado ao C+.

FIGURA 27 - Expressão relativa de TNF- $\alpha$  nos pulmões dos camundongos imunizados e desafiados.



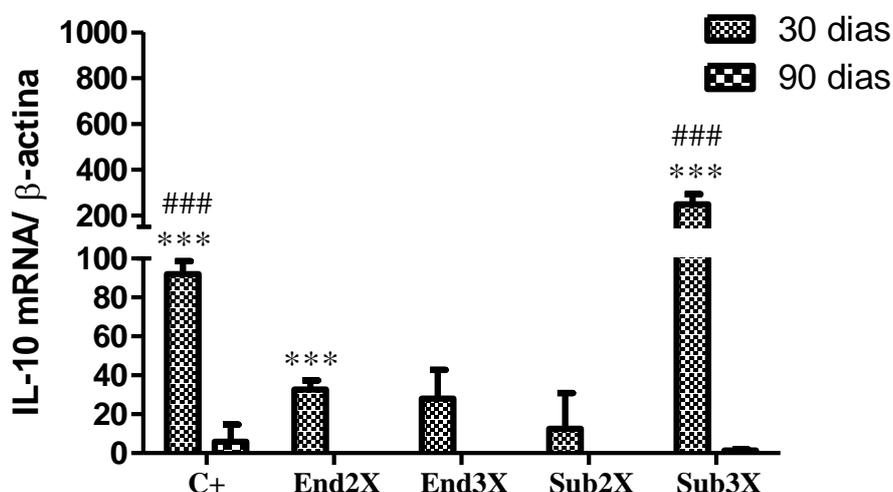
**Legenda:** Os animais imunizados com a LevRad foram desafiados com o fungo virulento não irradiado 30 dias após a última imunização e submetidos à eutanásia 30 e 90 dias após o desafio. **C+** - animais infectados; **End2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **Sub3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica nos pulmões dos animais de cada grupo (n=5 animais) normalizada em relação à  $\beta$  - actina . Foi considerado um aumento de duas vezes como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-). \*\*\* Significativamente diferente quando comparado ao ponto de 30 dias; ### Significativamente diferente quando comparado ao C+; &&& Significativamente diferente quando comparado ao End2X e Sub2X.

FIGURA 28 - Expressão relativa de iNOS nos pulmões dos camundongos imunizados e desafiados.



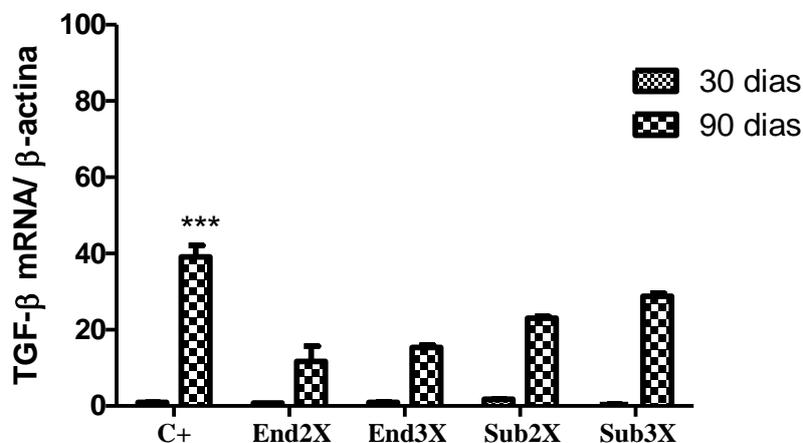
**Legenda:** Os animais imunizados com a LevRad foram desafiados com o fungo virulento não irradiado 30 dias após a última imunização e submetidos à eutanásia 30 e 90 dias após o desafio. **C+** - animais infectados; **End2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **Sub3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica nos pulmões dos animais de cada grupo (n=5 animais) normalizada em relação à β – actina . Foi considerado um aumento de duas vezes como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-). \*\*\* Significativamente diferente quando comparado ao ponto de 30 dias; ### Significativamente diferente quando comparado ao C+.

FIGURA 29 - Expressão relativa de IL-10 nos pulmões dos camundongos imunizados e desafiados.



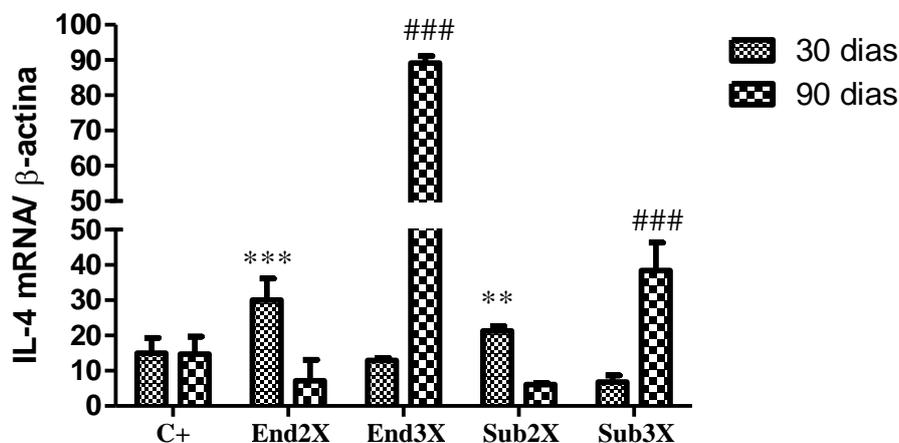
**Legenda:** Os animais imunizados com a LevRad foram desafiados com o fungo virulento não irradiado 30 dias após a última imunização e submetidos à eutanásia 30 e 90 dias após o desafio. **C+** - animais infectados; **End2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **Sub3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica nos pulmões dos animais de cada grupo (n=5 animais) normalizada em relação à  $\beta$  - actina . Foi considerado um aumento de duas vezes como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-). \*\*\* Significativamente diferente quando comparado ao ponto de 30 dias; ### Significativamente diferente quando comparado ao End2X, End3X e Sub2X.

FIGURA 30 - Expressão relativa de TGF- $\beta$  nos pulmões dos camundongos imunizados e desafiados.



**Legenda:** Os animais imunizados com a LevRad foram desafiados com o fungo virulento não irradiado 30 dias após a última imunização e submetidos à eutanásia 30 e 90 dias após o desafio. **C+** - animais infectados; **End2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **Sub3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica nos pulmões dos animais de cada grupo (n=5 animais) normalizada em relação à  $\beta$  - actina . Foi considerado um aumento de duas vezes como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-). \*\*\* Significativamente diferente quando comparado aos subgrupos imunizados End2X, End3X, Sub2X e Sub3X.

FIGURA 31 - Expressão relativa de IL-4 nos pulmões dos camundongos imunizados e desafiados



**Legenda:** Os animais imunizados com a LevRad foram desafiados com o fungo virulento não irradiado 30 dias após a última imunização e submetidos à eutanásia 30 e 90 dias após o desafio. **C+** - animais infectados; **End2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2X** - animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **Sub3X** - animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica nos pulmões dos animais de cada grupo (n=5 animais) normalizada em relação à  $\beta$  - actina . Foi considerado um aumento de duas vezes como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-). \*\*\* e \*\* Significativamente diferente quando comparado ao C+, End3X e Sub3X. ### Significativamente diferente quando comparado ao C+, End2X e Sub2X.

### 5.3.8 Determinação por ELISA do perfil de citocinas em resposta a LevRad

Para avaliar do perfil de citocinas, esplenócitos extraídos dos camundongos BALB/c apenas imunizados com a LevRad (LevRad) ou imunizados e desafiados com as células leveduriformes de *P. brasiliensis* não irradiado (LevRad\*) foram cultivados na ausência ou na presença de estímulo antigênico (ePb18, ePb18\* ou ConA). As células do baço de animais que não sofreram qualquer tipo de intervenção (C-) e infectados com o *P. brasiliensis* não irradiado (C+) foram utilizadas como controle do experimento. Os sobrenadantes da cultura de esplenócitos foram coletados após 72h, para a dosagem de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , utilizando kit de ELISA DuoSet (R&D Systems, EUA).

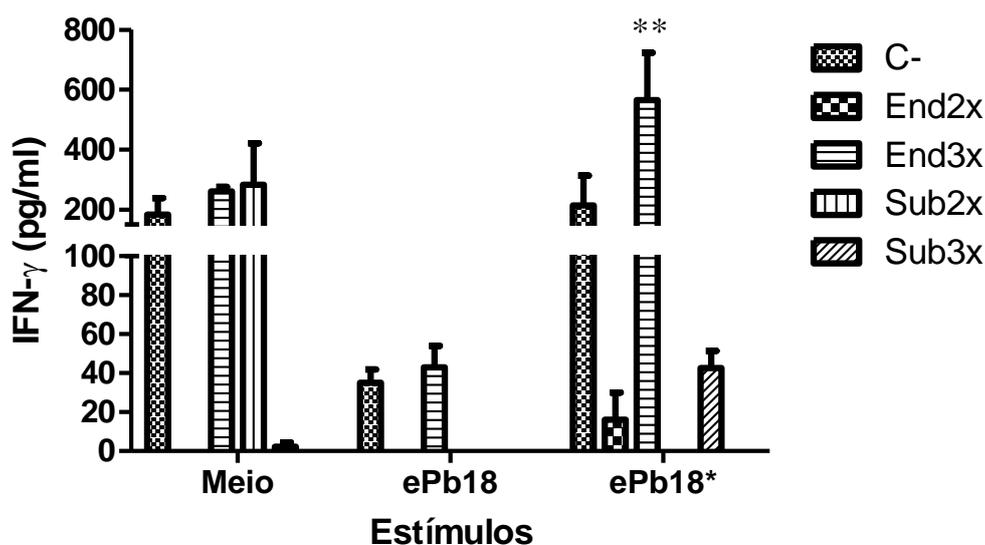
Produção significativa de IFN- $\gamma$  foi detectada no sobrenadante de cultura das células do baço dos animais imunizados (LevRad), subgrupo End3x, em resposta ao ePb18\*, comparada aos demais grupos estimulados em cultura pelo ePb18\*, a todos os grupos estimulados pelo ePb18 e aos grupos de animais não estimulados ( $p < 0.01$ ) (Fig. 32). O sobrenadante de cultura dos esplenócitos obtidos a partir dos grupos dos animais imunizados e desafiados (LevRad\*), subgrupo End3x, cultivados na ausência de estímulo apresentaram, 30 dias após o desafio, níveis significativos de IFN- $\gamma$  em relação ao grupo C- ( $p < 0.05$ ). Os níveis dessa citocina apresentaram-se significativamente aumentados nos subgrupos End3x e Sub3x estimulados em cultura pelos extratos fúngicos (ePb18 e ePb18\*), quando comparados aos demais grupos e subgrupos estimulados com esses antígenos e aos não estimulados ( $p < 0.001$ ) (Fig. 33A). Após 90 dias do desafio, houve diminuição dos níveis dessa citocina em todos os grupos e subgrupos analisados (Figura 33B).

Os níveis da citocina IL-10, detectados no sobrenadante de cultura dos esplenócitos não estimulados, obtidos de todos os grupos de camundongos imunizados analisados 30 dias após o desafio (LevRad\*), exceto End2x, apresentaram-se significativamente elevado ( $p < 0.001$ ), em relação ao C- e C+. O ePb18 foi capaz de inibir, *in vitro*, a produção de IL-10 em End3x, Sub2x e Sub3x. O ePb18\* inibiu a produção significativa dessa citocina em End3x, mas estimulou a produção significativa em Sub2x e Sub3x ( $p < 0.001$ ) (Fig. 34A). Após 90 dias, os níveis de IL-10 apresentaram-se baixos em relação ao observados anteriormente no ponto de 30 dias. Houve produção significativa dessa citocina no sobrenadante de cultura das células dos subgrupos Sub2x e Sub3x cultivados na ausência de estímulo, em relação ao C-, C+ e

aos demais subgrupos imunizados (End2x e End3x). Além disso, foi observado que ePb18\* suprimiu seus níveis em End2x e End3x (Fig. 34B).

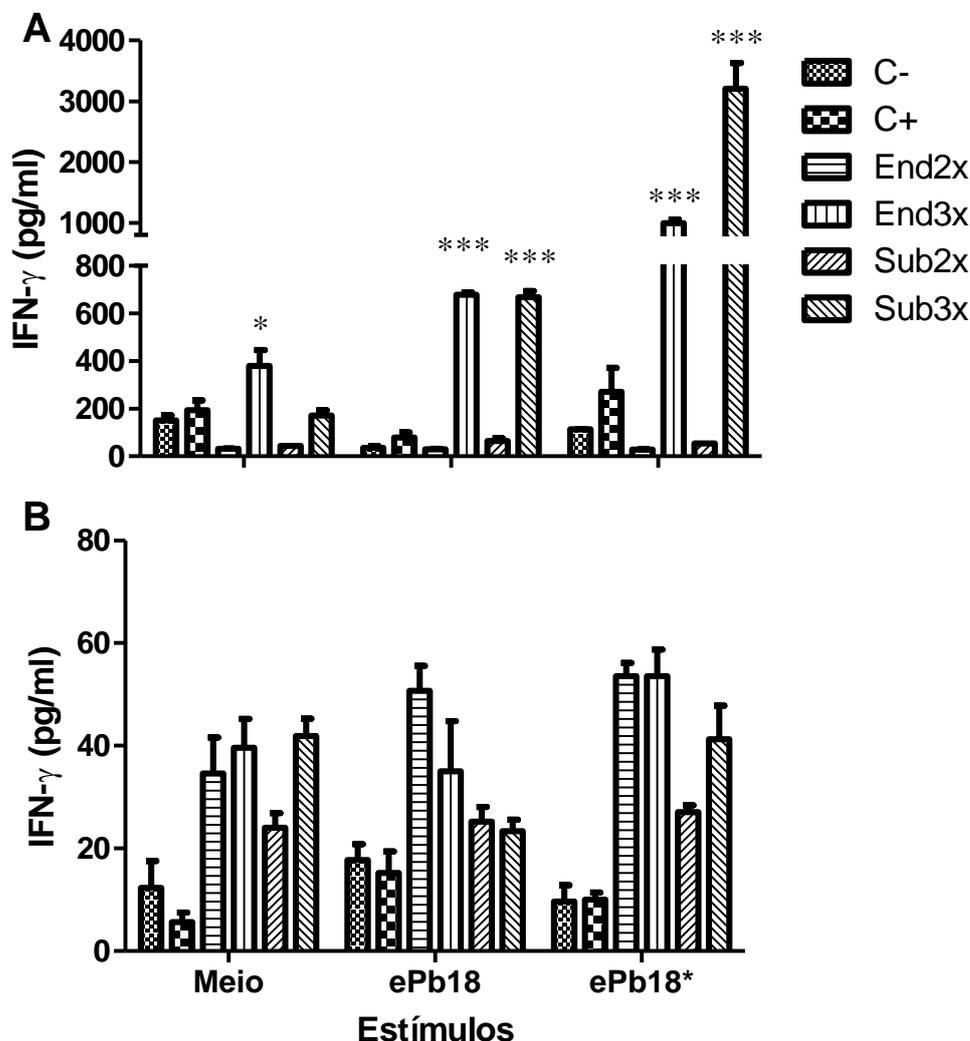
Os valores obtidos na detecção de IL-4 mostraram produção elevada dessa citocina por esplenócitos dos animais infectados (C+) cultivados na ausência de estímulo, obtidos 30 dias após infecção, em relação ao C- e demais subgrupos de animais imunizados ( $p < 0.001$ ). Pb18 estimulou, *in vitro*, a produção de IL-4 em End3x, Sub2x e Sub3x e, o ePb18\* estimulou a produção significativa dessa citocina em End3x e Sub3x ( $p < 0.001$ ) (Fig. 35A). Após 90 dias, os níveis de IL-4 foram significativos em relação ao C-, porém se mantiveram baixos e não houve diferença entre os grupos analisados (Fig. 35B).

FIGURA 32 - Nível de IFN- $\gamma$  presente no sobrenadante de cultura dos esplenócitos de camundongos imunizados (LevRad).



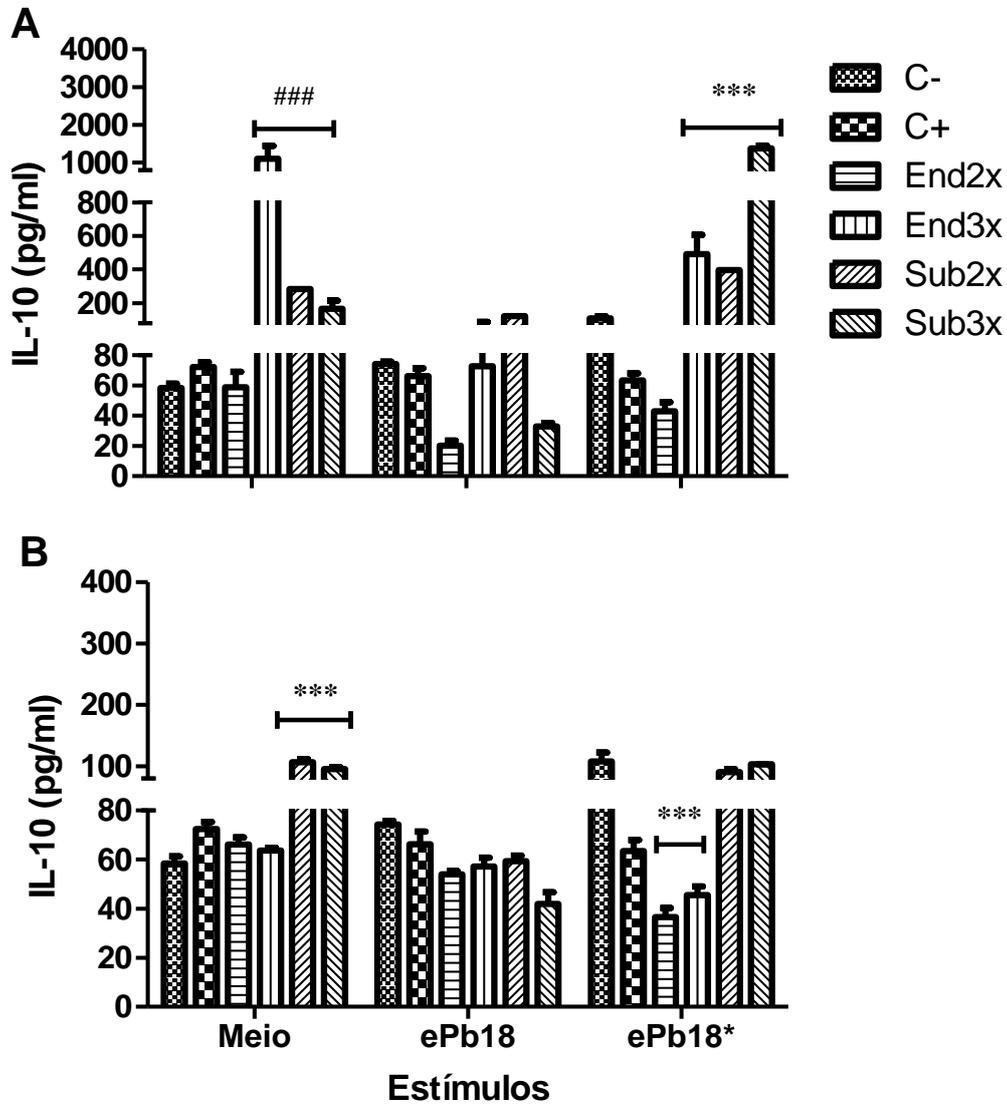
**Legenda:** Os camundongos BALB/c foram submetidos à eutanásia 15 dias após a última imunização. As células ( $5 \times 10^6$  células/poço) foram cultivadas em meio RPMI completo por 72h, a  $37^{\circ}$  C e  $CO_2$  5% na ausência ou presença de estímulo (Pb18 e Pb18\*). C- - grupo dos animais que não sofreram qualquer intervenção; End2x-animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; End3x-animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; Sub2x-animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; Sub3x-animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. \*\* Significativamente diferente quando comparado aos demais grupos estimulados com ePb18\*, aos grupos estimulados com ePb18 e aos grupos de animais não estimulados *in vitro* ( $P < 0.01$ ).

FIGURA 33 - Nível de IFN- $\gamma$  presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados e desafiados (LevRad\*).



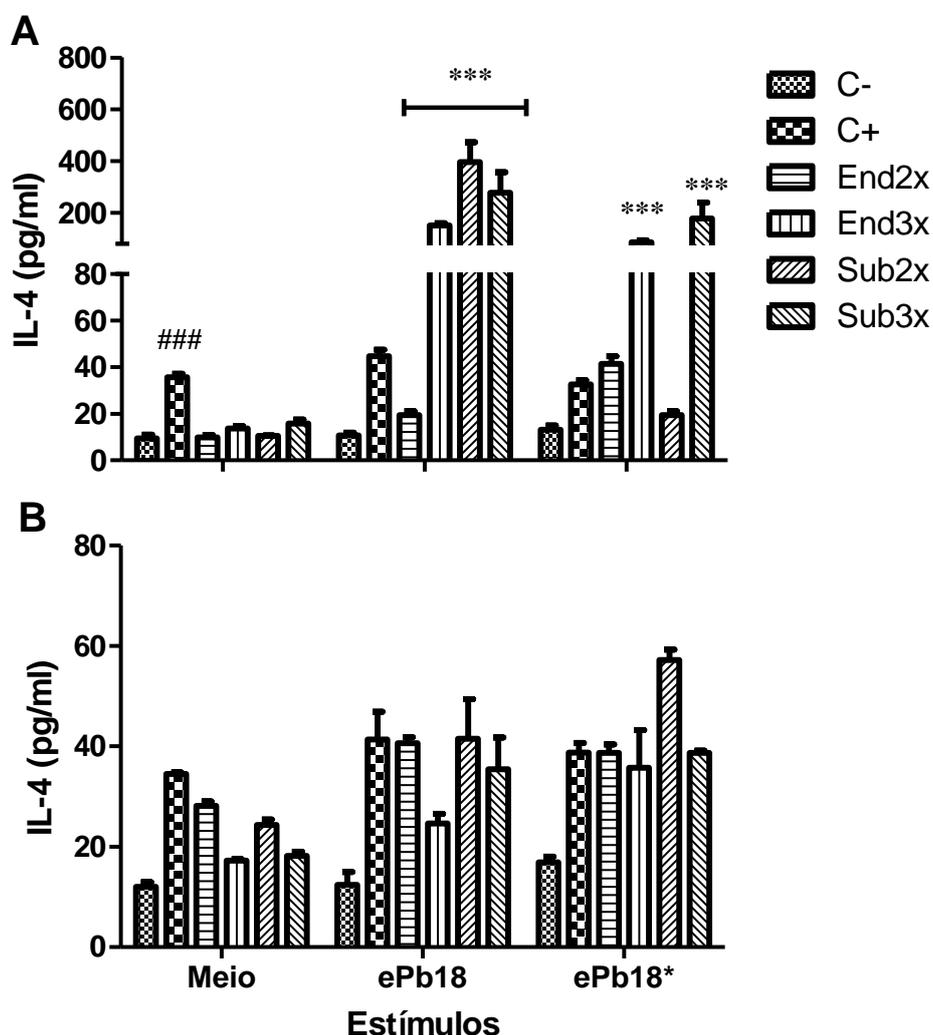
**Legenda:** Os camundongos BALB/c foram submetidos à eutanásia 30(A) e 90(B) dias após o desafio. As células ( $5 \times 10^6$  células/poço) foram cultivadas em meio RPMI completo por 72h, a  $37^{\circ}$  C e 5%  $CO_2$  na ausência ou presença de Pb18 e Pb18\*. C- - grupo dos animais que não sofreram intervenção; C+ - grupo dos animais infectados, pela via intratraqueal, com  $3 \times 10^5$  células de *P. brasiliensis* não irradiado End2x-animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; End3x-animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; Sub2x-animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; Sub3x-animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea.\* Significativamente diferente quando comparado ao C- ( $P < 0.01$ ); \*\*\* Significativamente diferente quando comparado ao C-, C+ e aos grupos dos animais imunizados estimulados com ePb18 e ePb18\* e aos grupos dos animais não estimulados *in vitro* ( $P < 0.01$ ).

FIGURA 34 - Nível de IL-10 presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados e desafiados (LevRad\*).



**Legenda:** Os camundongos BALB/c foram submetidos à eutanásia 30(A) e 90(B) dias após o desafio. As células ( $5 \times 10^6$  células/poço) foram cultivadas em meio RPMI-C por 72h, a  $37^\circ\text{C}$  e  $\text{CO}_2$  5% na ausência ou presença de ePb18 e ePb18\*. C- - grupo dos animais que não sofreram intervenção; C+- grupo dos animais infectados, pela via intratraqueal, com  $3 \times 10^5$  células de *P. brasiliensis* não irradiado **End2x**-animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3x**-animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2x**-animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **Sub3x**-animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. ### em A e \*\*\* em B Significativamente diferente quando comparado ao C-, C+ e aos subgrupos dos animais imunizados não estimulados *in vitro* ( $P < 0.001$ ); \*\*\* Significativamente diferente quando comparado ao C- e ao C+ ( $P < 0.001$ ).

FIGURA 35 - Nível de IL-4 presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados e desafiados (LevRad\*).



**Legenda:** Os camundongos BALB/c foram submetidos à eutanásia 30(A) e 90(B) dias após o desafio. As células ( $5 \times 10^6$  células/poço) foram cultivadas em meio RPMI completo por 72h, a  $37^{\circ}$  C e 5%  $CO_2$  na ausência ou presença de Pb18 e Pb18\*. C- - grupo dos animais que não sofreram intervenção; C+ - grupo dos animais infectados, pela via intratraqueal, com  $3 \times 10^5$  células de *P. brasiliensis* não irradiado **End2x**-animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa; **End3x**-animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa; **Sub2x**-animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea; **Sub3x**-animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea. ### Significativamente diferente quando comparado ao C- e aos subgrupos dos animais imunizados não estimulados *in vitro* ( $P < 0.001$ ); \*\*\* Significativamente diferente quando comparado ao C-, C+ e aos demais grupos imunizados estimulados com ePb18 e ePb18\* ( $P < 0.001$ ).

### 5.3.9 Sumário dos resultados

- Não houve recuperação de UFC em nenhum dos órgãos (pulmão, baço e fígado) dos camundongos imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea que foram desafiados i.t. com o fungo virulento não irradiado.
- Houve recuperação de UFC no pulmão dos camundongos imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea analisados 30 dias após o desafio i.t. com o fungo virulento não irradiado.
- Houve recuperação de UFC no pulmão dos camundongos imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa analisados 30 dias após o desafio i.t. com o fungo virulento não irradiado.
- Houve recuperação de UFC no pulmão, fígado e baço dos camundongos imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa analisados 30 dias após o desafio i.t. com o fungo virulento não irradiado.
- Os camundongos imunizados foram capazes de eliminar o fungo e controlar a infecção 90 dias após o desafio.
- Não foram observadas alterações histopatológicas em nenhum dos órgãos (pulmão, baço e fígado) dos animais imunizados, duas ou três vezes, tanto pela via subcutânea quanto pela via endovenosa. Apenas uma parte do parênquima pulmonar de um dos cinco camundongos imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea apresentou necrose extensa.
- A proliferação celular dos esplenócitos obtidos 30 dias após a infecção desafio dos animais imunizados três vezes consecutivas, tanto pela via endovenosa quanto pela via subcutânea, em resposta ao ePb18\* foi evidente. Sendo a proliferação similar às células estimuladas em cultura com o extrato do fungo não irradiado (ePb18).
- A LevRad induziu a produção de altos níveis de IgG anti-Mexo, principalmente em animais imunizados três vezes consecutivas, pela via endovenosa ou subcutânea, analisados 30 dias após o desafio.
- Não houve diferença significativa quanto aos níveis de IgG1 produzidos em resposta ao antígeno do fungo (Mexo) presentes nos soros dos animais infectados (C+) e animais imunizados (End2x, End3x, Sub2x e Sub3x), analisados 30 dias após a infecção/desafio. Porém, em End3x os altos níveis de IgG1 foram associados à produção significativa de IgG2a e IgG2b.

- Os altos níveis de IgG e seus isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b observados anteriormente, diminuíram consideravelmente após 90 dias da infecção desafio, onde também foi observado o controle da infecção.
- Os resultados referentes à quantificação relativa das citocinas, por PCR em tempo real, revelaram a expressão elevada de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e a baixa de IL-10, TGF- $\beta$  e iNOs nos pulmões dos camundongos imunizados três vezes consecutivas, pela via endovenosa, analisados 90 dias após o desafio, onde também foi observado o controle da infecção.
- Os resultados referentes à quantificação por ELISA revelaram a produção significativa de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4 no sobrenadante de cultura dos esplenócitos estimulados ou não com ePb18\*, obtidos 30 dias após o desafio de camundongos imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa e subcutânea (End3x e Sub3x).

Em conjunto, os resultados demonstraram o potencial da LevRad em induzir resposta imune protetora eficiente contra amostras altamente virulenta do *P. brasiliensis*.

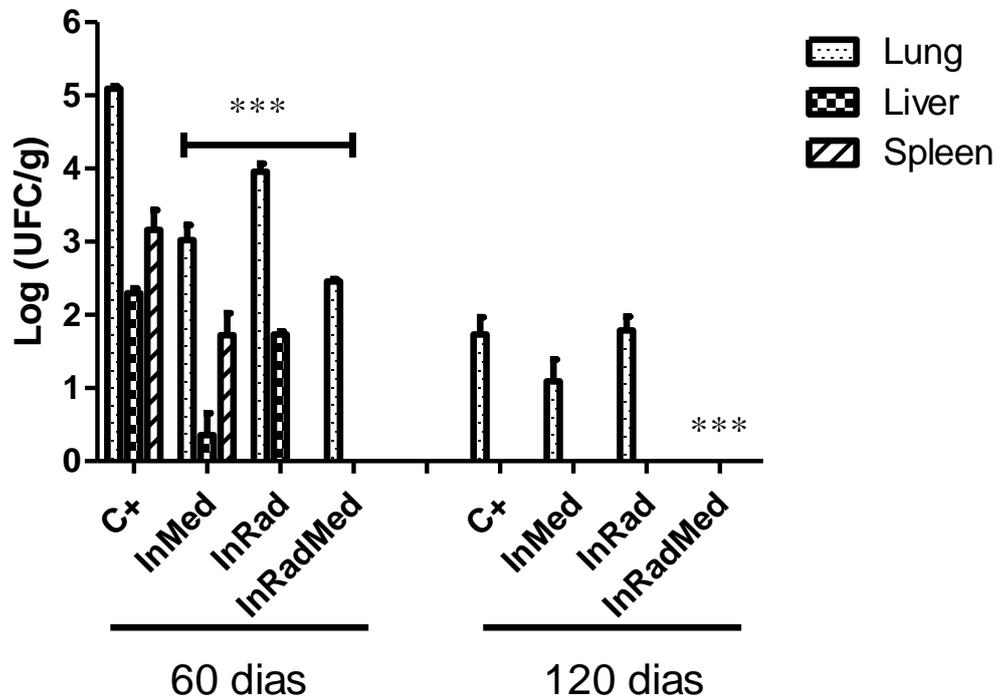
## 5.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA LevRad EM PCM EXPERIMENTAL

### 5.4.1 Determinação das UFCs

A avaliação do efeito protetor conferido pela imunização com a LevRad (LevRad) associada ou não ao quimioterápico (InRadMed) em PCM experimental foi inicialmente investigada a partir da recuperação das UFCs nos órgãos (pulmão, baço e fígado) dos camundongos BALB/c avaliados 60 e 120 dias após a infecção intratraqueal (30 e 90 dias após o início do tratamento) com  $3 \times 10^5$  células viáveis de *P. brasiliensis* (Pb18) virulento não irradiado. Os dados obtidos foram expressos em  $\text{Log}_{10}$  da média  $\pm$  o desvio padrão das UFCs por grama de tecidos dos animais. Os camundongos, infectados com o fungo não irradiado (C+) e infectado e tratados com o fluconazol (InMed) foram utilizados como controles. Os animais que não sofreram qualquer intervenção, foram utilizados como controle negativo (C-).

Houve diminuição significativa de UFCs, em relação ao C+, em todos os órgãos (pulmão, baço e fígado) dos animais dos grupos InMed, InRad e InRadMed analisados 60 dias após infecção ( $p < 0,001$ ), exceto no baço dos animais do grupo InMed e InRad. A redução no número de UFCs no pulmão foi equivalente a 98,89% em InMed, 90,45% em InRad e 99,24% em InRadMed, em relação ao C+. Também foi verificada diminuição significativa das UFCs no pulmão do grupo InRadMed em relação ao InMed e InRad ( $p < 0,05$ ). Não houve recuperação de colônias fúngicas no fígado e baço dos animais desses grupos (Fig. 36). Após 120 dias, foi observado o controle da infecção em todos os grupos analisados (InMed, InRad, InRadMed e, inclusive C+). Porém, o melhor resultado foi obtido em animais infectados e, posteriormente, imunizados com a LevRad em associação ao fluconazol (InRadMed), onde não foram observadas colônias fúngicas em nenhum dos órgãos (pulmão, baço e fígado) analisados (Fig. 36).

FIGURA 36 - Determinação das UFCs nos órgãos (pulmão, fígado e baço) dos camundongos BALB/c infectados e, posteriormente, tratados.



**Legenda:** As UFCs foram determinadas 60 e 120 dias após infecção com  $3 \times 10^5$  células leveduriformes viáveis de *P. brasiliensis* virulento não irradiado em animais submetidos à imunização com a LevRad associada ou não ao fluconazol. **C-** - grupo dos animais que não sofreram qualquer intervenção; **C+** - grupo dos animais infectados i.t. com o Pb18; **InMed** - grupo dos animais infectados e tratados com o fluconazol; **InRad** - grupo dos animais infectados e tratados com a LevRad; **InRadMed** - grupo dos animais infectados e tratados com a LevRad associada ao fluconazol. Os dados obtidos foram expressos em  $\text{Log}_{10}$  da média  $\pm$  o desvio padrão das UFCs por grama de tecidos dos animais em cada grupo experimental (n=5). \*\*\* diferença significativa em relação ao C+ ( $p < 0.001$ ). \* diferença significativa em relação ( $p < 0.05$ ) a InMed e InRad.

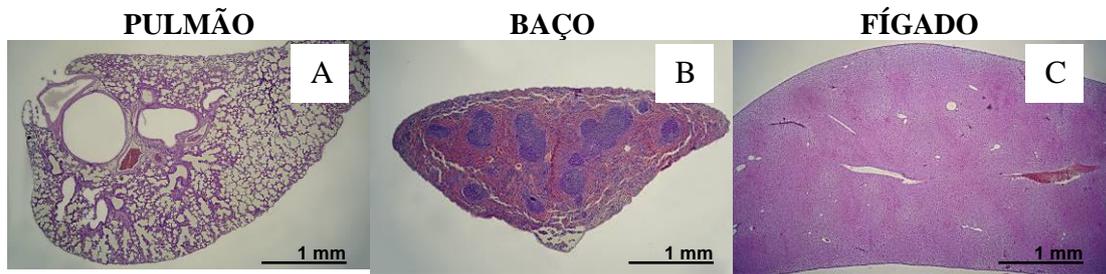
#### 5.4.2 Análise histopatológica dos órgãos dos animais infectados e tratados

Os órgãos (pulmão, baço e fígado) dos animais dos grupos InRad (Fig 38J-L) e InRadMed (Fig. 38M-O) foram removidos 60 e 120 dias após infecção com o Pb18 e comparados aos órgãos dos animais que não sofreram qualquer tipo de intervenção (C-) (Fig. 37A-C), aos dos animais infectados com o *P. brasiliensis* não irradiados (C+) (Fig. 38A-F e Fig. 39A-C) e aos dos animais infectados e tratados com o fluconazol (InMed) (Fig. 38G-I).

A análise histopatológica confirmou os resultados obtidos no ensaio para a determinação de UFCs. Após 60 dias de infecção foi observada uma extensa destruição tecidual com o desenvolvimento de intensa pneumonia granulomatosa multifocal intersticial a coalescente constituída por infiltrado linfocitário e neutrofílico associados a células gigantes no pulmão dos animais infectados (C +) (Fig. 38C). Havia um grande número de estruturas fúngicas intra e extracelulares com membrana birrefringente consistente ao *P. brasiliensis* (Fig. 38A e 40 A-B). O fígado apresentou leve a moderado granulomas multifocais circundado por tecido conjuntivo fibroso constituído por linfócitos e células fúngicas no seu interior (Fig. 38B). Não houve alteração histopatológica no baço desses animais (Fig. 39C). Aos 120 dias, o pulmão apresentou lesão granulomatosa focal discreta, constituída por infiltrado linfocitário com células gigantes e um pequeno número de células fúngicas viáveis (Fig. 38D). Não houve alteração histopatológica no fígado e baço desses animais (Fig. 38E e F).

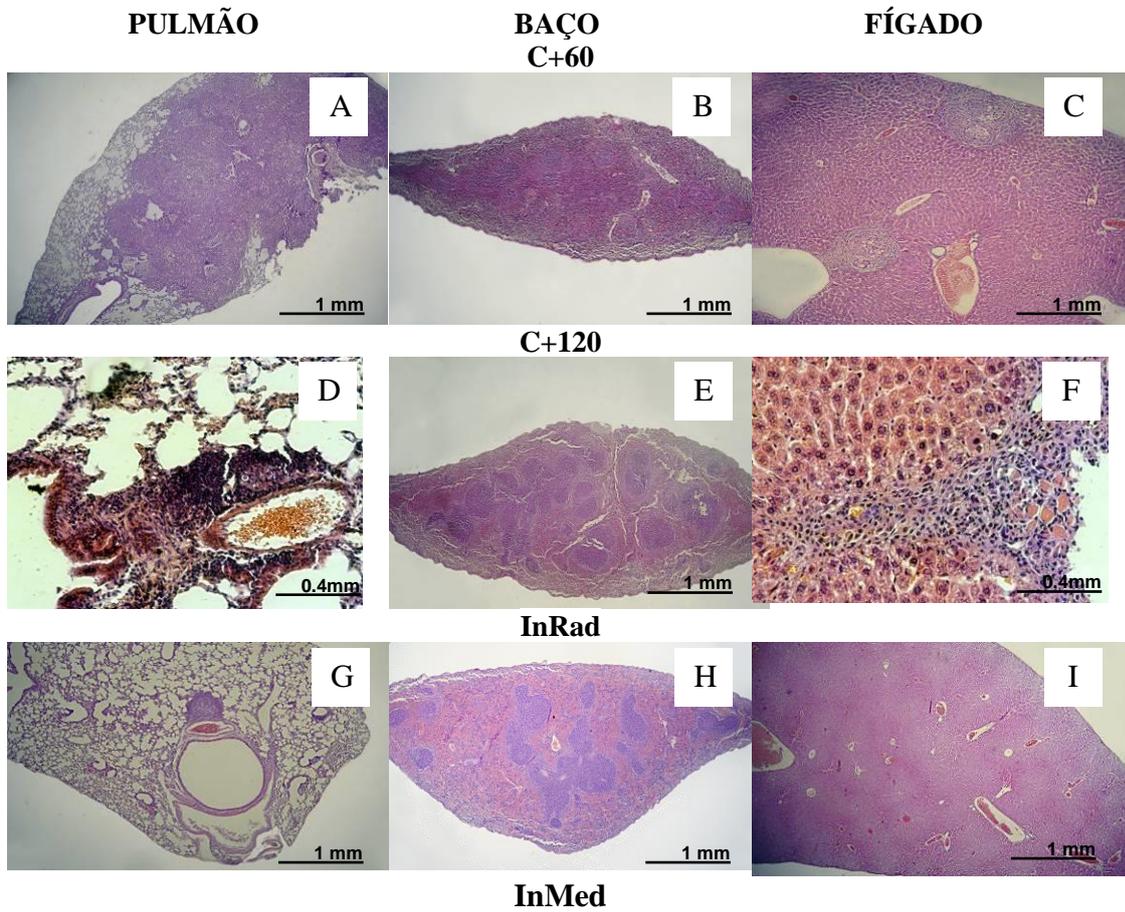
O pulmão dos animais do grupo InRadMed apresentou-se livre de carga fúngica e lesão granulomatosa com infiltrado inflamatório nos dois pontos de tempo investigados (Fig. 38M), em comparação ao C+. No entanto, o pulmão do grupo InRad e InMed, analisados 60 dias após a infecção, apresentou lesões granulomatosas bem organizada focal e discreta com pequeno número de células leveduriformes (Fig. 38G e J; e Fig. 40A e B). Nenhum dano considerável foi observado no fígado e baço desses animais analisados 60 dias após infecção, bem como em qualquer outro órgão analisado 120 dias depois (37H-I; K-L e N-O) comparados aos órgão do C- (Fig. 37).

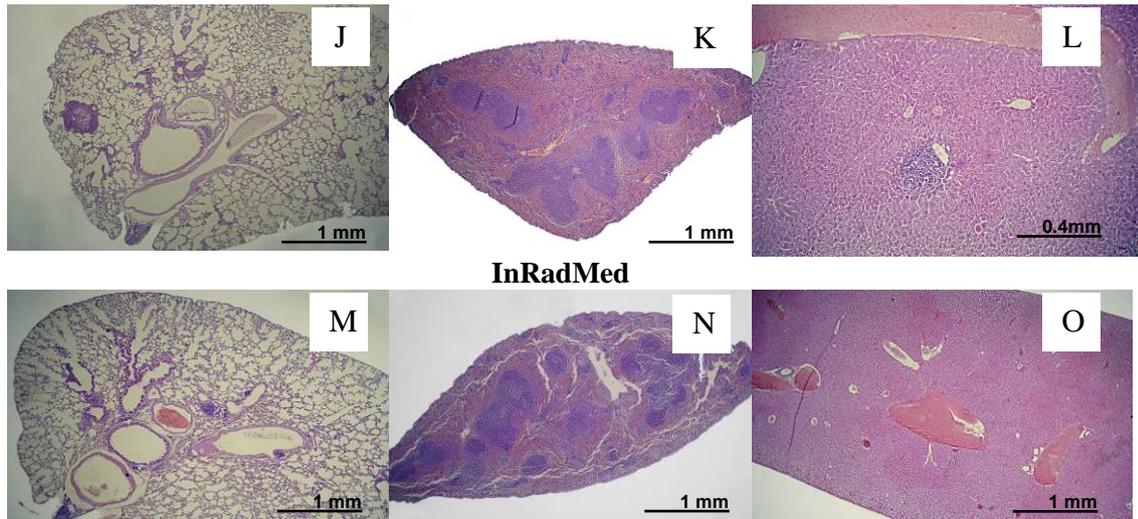
FIGURA 37 - Histopatologia representativa dos órgãos dos camundongos BALB/c que não sofreram qualquer intervenção (C-).



**Legenda:** Não houve alterações histopatológicas dignas de nota em nenhum dos órgãos analisados. Coloração por HE.

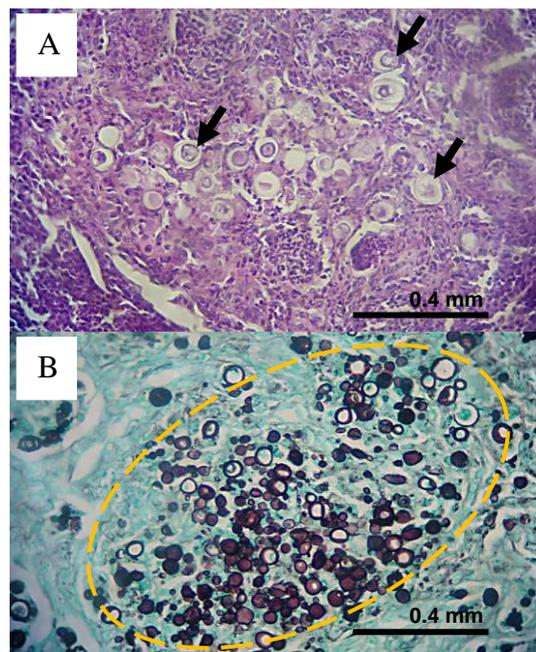
FIGURA 38 - Histopatologia representativa dos órgãos dos camundongos BALB/c infectados e tratados.

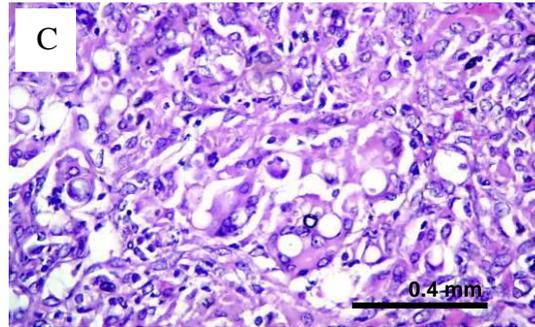




**Legenda:** As alterações foram verificadas 60 e 120 dias após infecção com  $3 \times 10^5$  células leveduriformes viáveis de *P. brasiliensis* virulento não irradiado em animais submetidos à imunização com a LevRad associada ou não ao fluconazol. **Em A** – Extenso comprometimento do parênquima pulmonar; **Em C** – granulomas circundados por tecido conjuntivo fibroso e células fúngicas no seu interior; **Em D** – lesão granulomatosa focal discreta; **Em G e F** – granuloma focal bem organizado. Nos demais órgãos não foram observadas alterações dignas de nota. C+ - animais infectados i.t. com o Pb18; **InMed** - animais infectados e tratados com o fluconazol; **InRad** - animais infectados e tratados com a LevRad; **InRadMed** - animais infectados e tratados com a LevRad associada ao fluconazol. Coloração por HE.

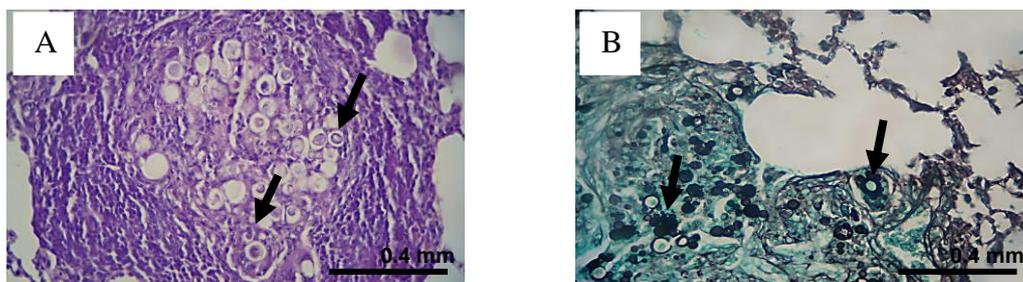
FIGURA 39 - Histopatologia representativa dos órgãos (pulmão) dos camundongos BALB/c infectados as células leveduriformes viáveis de *P. brasiliensis* virulento não irradiado.





**Legenda:** **Em A** – estruturas fúngicas viáveis intra e extracelulares com membrana birrefringente compatíveis ao *P. brasiliensis* (coloração HE, aumento 400x); **Em B** – estruturas fúngicas coradas pela prata (coloração Grocott, aumento 400x); **Em C** – infiltrado linfohistiocitário e neutrofílico associados a células gigantes (coloração HE, aumento 400x).

FIGURA 40 - Histopatologia representativa dos órgãos (pulmão) dos camundongos BALB/c infectados e tratados com a LevRad associada ou não ao fluconazol.



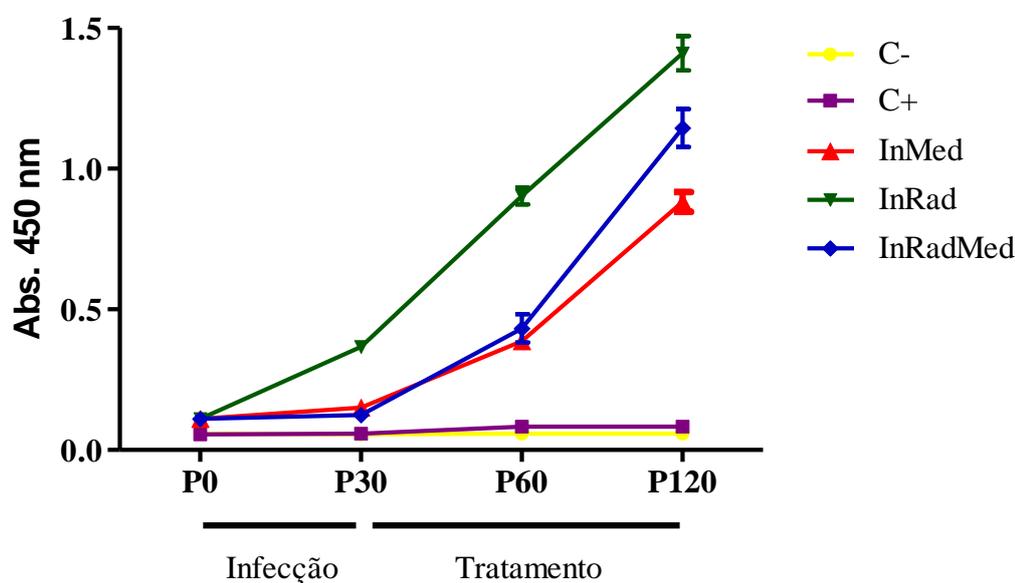
**Legenda:** **Em A** – estruturas fúngicas viáveis com membrana birrefringente compatíveis ao *P. brasiliensis* (coloração HE, aumento 400x); **Em B** – estruturas fúngicas coradas pela prata (coloração Grocott, aumento 400x).

#### 5.4.3 Determinação de IgG total anti-Mexo nos soros dos camundongos infectados e tratados

Os soros dos camundongos infectados e, posteriormente imunizados com a LevRad (InRad) ou tratados com o fluconazol associado ou não à LevRad (InRadMed e InRad) foram coletados antes (P0) e 30 (P30), 60 (P60) e 120 (P120) após infecção para a avaliação, por ELISA, da resposta imune específica ao exoantígeno do fungo (Mexo). Soros de animais não infectados foram utilizados como controle negativo (C-) e soros obtidos de animais infectados com o fungo não irradiado e não tratados foram utilizados como controle positivo (C+). Os resultados expressos em densidade óptica a 450 nm representam a média  $\pm$  desvio padrão da triplicata das reações de um pool dos soros de camundongos por grupo.

Após a segunda semana do início do tratamento dos animais infectados, níveis significativos de IgG total anti-Mexo foram verificados nos soros dos animais tratados com o fluconazol (InMed) e nos soros dos animais submetidos a imunização com a LevRad associada ou não ao fluconazol (InRad e InRadMed, respectivamente), em relação aos soros dos animais dos grupos C+ e C- ( $p < 0,001$ ). Os níveis de anticorpos específicos em InRad foram significativos em relação aos grupos InMed e InRadMed ( $p < 0,001$ ) (Fig. 41).

FIGURA 41 - Detecção de IgG anti-Mexo nos soros dos animais infectados e, posteriormente imunizados com a LevRad associada ou não ao fluconazol.



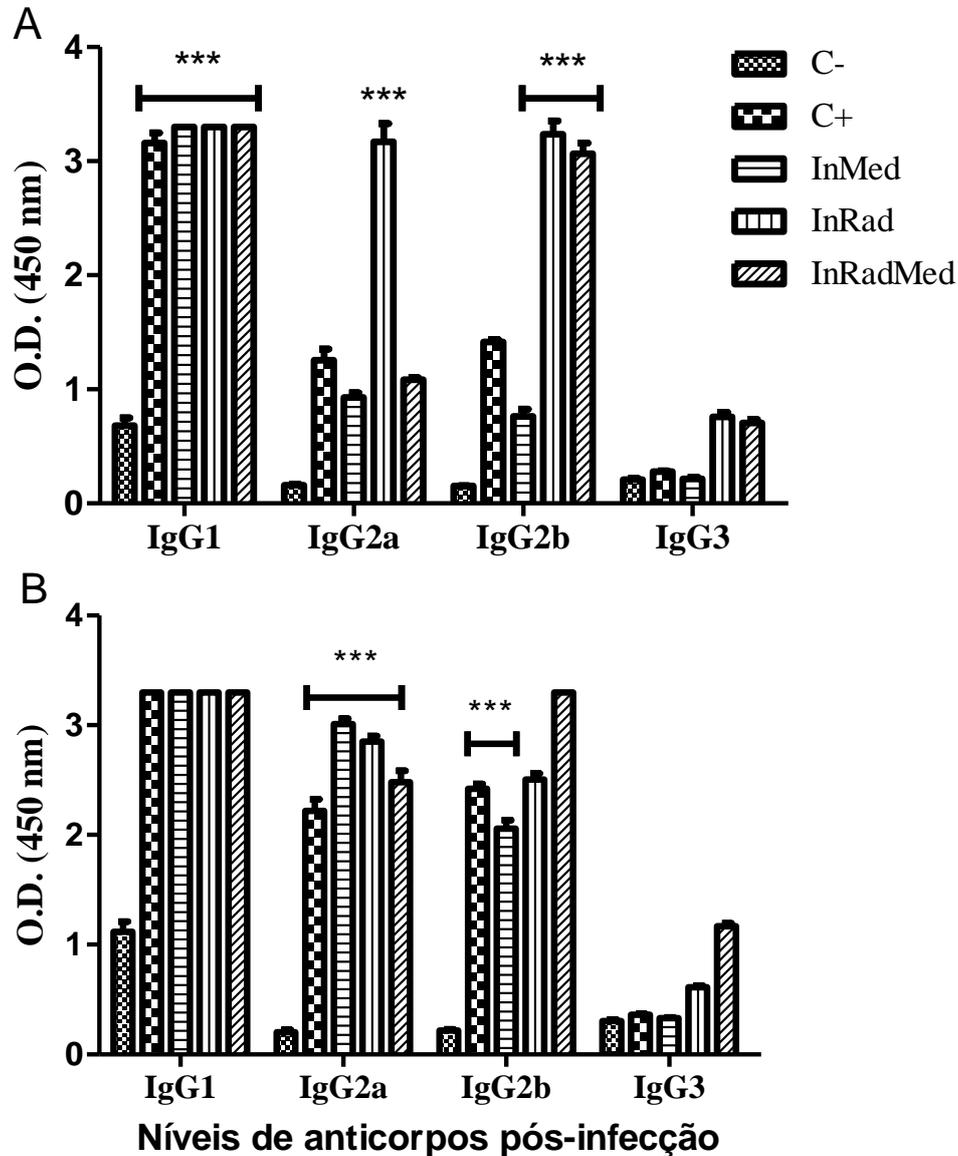
**Legenda:** Os soros dos camundongos infectados e tratados foram testados por ELISA, diluição 1:100, quanto a presença de IgG anti-Mexo antes (P0) e 30 (P30), 60 (P60) e 120 (P120) dias após a infecção. - C- grupo dos animais que não sofreram qualquer intervenção; C+ - grupo dos animais infectados i.t. com o Pb18; **InMed** - grupo dos animais infectados e tratados com o fluconazol; **InRad** - grupo dos animais infectados e tratados com a LevRad; **InRadMed** - grupo dos animais infectados e tratados com a LevRad associada ao fluconazol. Os resultados expressos em densidade óptica a 450 nm representam a média  $\pm$  o desvio padrão da triplicata das reações de um pool de soros de camundongos por grupo. Para o ensaio foi utilizado 0,5  $\mu$ g/poço do Mexo. Experimento realizado com n=5.

#### 5.4.4 Determinação de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-Mexo nos soros dos camundongos infectados e tratados

Ensaio de ELISA, diluição 1:100, foram realizados para determinar o perfil dos isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-Mexo, nos soros dos camundongos infectados e, posteriormente imunizados com a LevRad (InRad) ou tratados com o fluconazol associado ou não à LevRad (InRadMed e InRad). Soros de animais não infectados foram utilizados como controle negativo (C-) e soros obtidos de animais infectados com o fungo não irradiado e não tratados foram utilizados como controle positivo (C+). Todos os soros foram coletados 60 e 120 dias após infecção (30 e 90 dias após o início do tratamento). Os resultados expressos em densidade óptica a 450 nm representam a média  $\pm$  o desvio padrão da triplicata das reações de um pool de soros de camundongos por grupo.

Os resultados observados na figura 42A mostram a produção significativa de IgG1 anti-Mexo nos soros dos animais de todos os grupos (InRad, InRadMed, InMed e C+) analisados 60 dias após infecção, em relação ao C- e aos demais isotipos (IgG2a, IgG2b e IgG3) ( $p < 0.001$ ), exceto em relação aos níveis de IgG2a e IgG2b em InRad e IgG2b em InRadMed. Após 120 dias foram observados aumento significativo dos níveis de IgG2a em C+, InMed e InRadMed e IgG2b em C+ e InMed em relação ao ponto de 30 dias e ao C- ( $p < 0.001$ ) (Fig. 42B).

FIGURA 42 - Perfil de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-Mexo nos soros dos camundongos BALB/c infectados e, posteriormente imunizados com a LevRad associada ou não ao fluconazol.



**Legenda:** Os soros dos camundongos dos grupos InMed, InRad e InRadMed foram testados, 60(A) e 120 (B) dias após infecção, em ensaio de ELISA, diluição 1:100, na presença do antígeno Mexo. Soros de animais não infectados (C-) e infectados (C+) foram utilizados como controle. **InMed** - grupo dos animais infectados e tratados com o fluconazol; **InRad** - grupo dos animais infectados e tratados com a LevRad; **InRadMed** - grupo dos animais infectados e tratados com a LevRad associada ao fluconazol. Os resultados foram expressos em densidade óptica a 450 nm. Para o ensaio foi utilizado 0,5 µg/poço do Mexo. Experimento realizado com n=5. \*\*\* diferença significativa em relação ao C+ (p<0.001) e ao demais isotipos (IgG2a e IgG2b). ### diferença significativa em relação ao C- (p<0.001) e ao ponto analisado 30 dias após infecção.

#### 5.4.5 Níveis transcritos de citocinas e da enzima iNOS em camundongos infectados e tratados

Níveis transcritos de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-4) e da enzima iNOS foram medidos, por PCR em tempo real, no pulmão dos camundongos infectados e, posteriormente imunizados com a LevRad (InRad) ou tratados com o fluconazol associado ou não à LevRad (InRadMed e InMed). Os pulmões dos animais infectados com o fungo não irradiado e não tratados foram utilizados como controle positivo (C+). Os pulmões dos animais não infectados (C-) foram utilizados para obtenção dos níveis basais de expressão das citocinas e da iNOS. Foi considerado um aumento de duas vezes mais como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-). Os resultados expressos indicam a quantificação relativa da expressão gênica normalizada em relação ao gene constitutivo ( $\beta$ -actina) em cada grupo analisado.

Os resultados mostram um aumento significativo dos níveis transcritos de IFN- $\gamma$  nos pulmões dos animais do grupo InRad em relação aos dos grupos C+ ( $p < 0.001$ ), InMed e InRadMed ( $p < 0.05$ ) analisados 60 dias após infecção. Após 120 dias de infecção, os níveis transcritos de IFN- $\gamma$  aumentaram em todos os grupos analisados, mas a expressão em InRad apresentou-se significativamente maior em relação ao C+, InMed e InRadMed e em InRadMed em relação ao C+ e InMed ( $p < 0.001$ ) (Fig. 43).

Com relação a IL-10, houve expressão significativa nos pulmões dos animais dos grupos InMed, InRad e InRadMed, analisados 60 dias após infecção, em relação ao C+ ( $p < 0.001$ ). Diminuição significativa foi observada 120 dias depois ( $p < 0.01$ ) (Fig. 5B). Ao mesmo tempo, houve diminuição significativa da expressão de IL-4 em todos os grupos analisados em relação ao C+ ( $p < 0.001$ ) (Fig. 44).

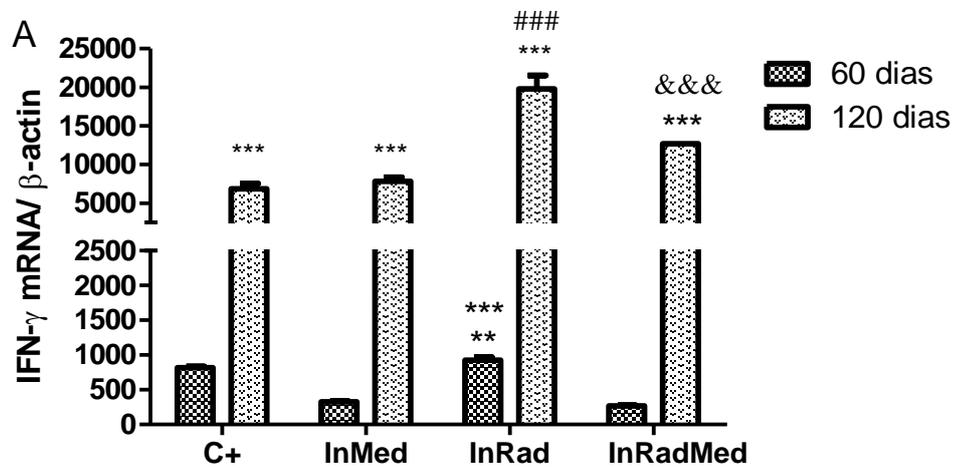
Houve expressão significativa de iNOS no grupo InRad analisado 60 dias após infecção ( $p < 0.001$ ). Todos os grupos de animais infectados e tratados (InMed, InRad e InRadMed) apresentaram aumento significativo da expressão de iNOS nos pulmões dos animais analisados 120 dias após infecção quando comparados ao primeiro ponto ( $p < 0.001$ ). Ao mesmo tempo, houve expressão significativa de iNOS no pulmão dos animais dos grupos InRad e InRadMed em relação ao C+ e InMed ( $p < 0.001$ ) (Fig. 45).

Níveis transcritos de TNF- $\alpha$  apresentaram-se significativamente aumentados 60 dias após infecção nos pulmões do grupo InRad, em relação ao C+, InMed e InRadMed.

( $p < 0.001$ ). Após 120 dias, esses níveis diminuíram significativamente em relação ao C+ ( $p < 0.001$ ) (Fig. 46).

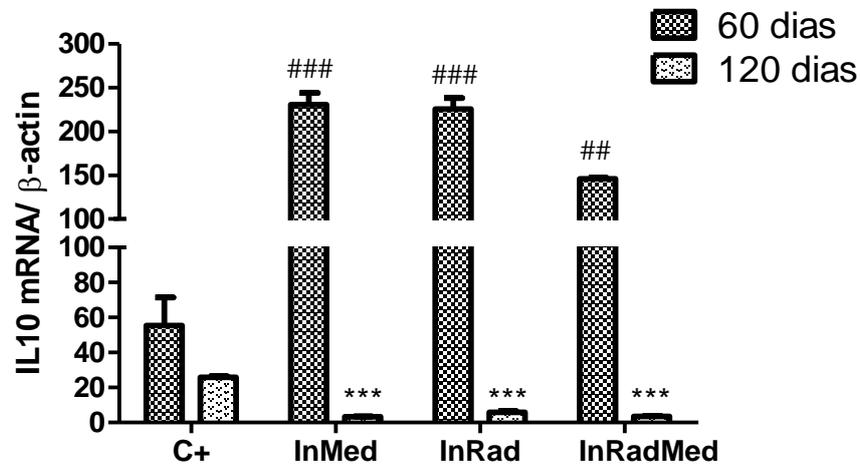
Por fim, houve expressão de baixos níveis de TGF- $\beta$  em todos os grupos analisados 60 dias após infecção, entretanto 120 dias depois foi observado o aumento desses níveis. Os níveis transcritos de TGF- $\beta$  em C+ foram significativos em relação aos outros grupos ( $p < 0.001$ ) (Fig. 47).

FIGURA 43 - Expressão relativa de IFN- $\gamma$  nos pulmões dos camundongos infectados e tratados.



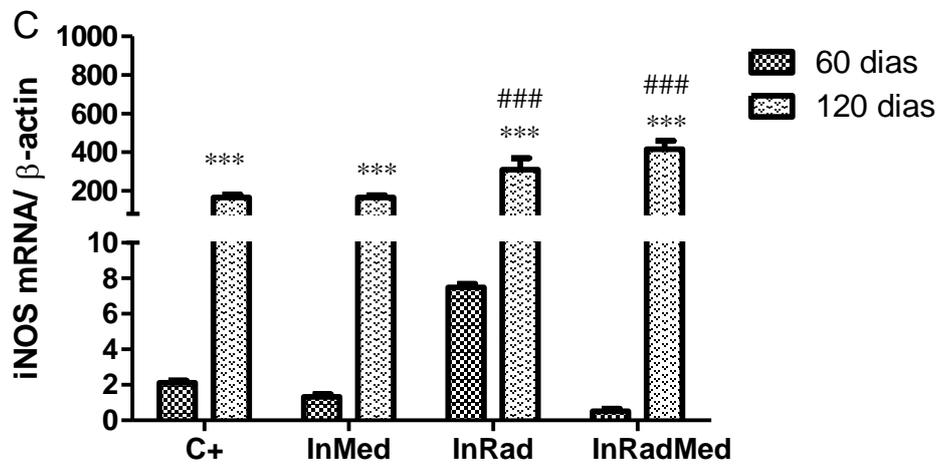
**Legenda:** Os animais infectados com o fungo não irradiado (Pb18) foram tratados com o fluconazol (InMed), imunizados com a LevRad (InRad) ou imunizados com a LevRad associada ao fluconazol (InRadMed) e analisados 60 e 120 dias após infecção. Os animais que não sofreram qualquer intervenção (C-) e os infectados com o fungo virulento não irradiado (C+) foram utilizados como controle. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica nos pulmões dos animais de cada grupo (n=5 animais) normalizada em relação à  $\beta$  - actina . Foi considerado um aumento de duas vezes como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-).

FIGURA 44 - Expressão relativa de IL-10 nos pulmões dos camundongos infectados e tratados.



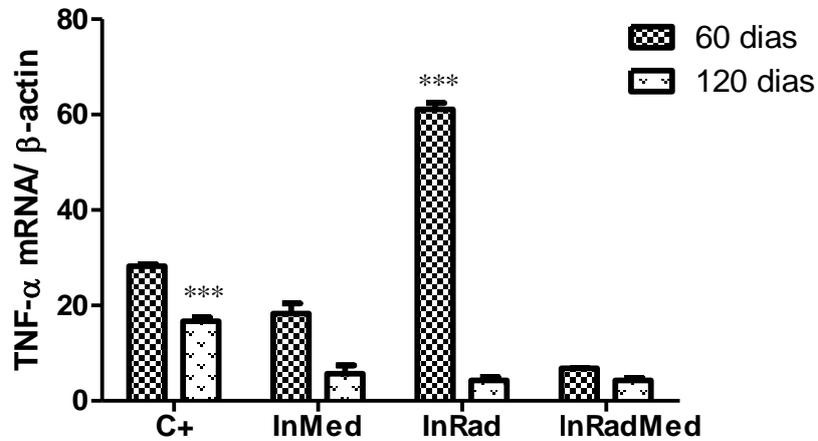
**Legenda:** Os animais infectados com o fungo não irradiado (Pb18) foram tratados com o fluconazol (InMed), imunizados com a LevRad (InRad) ou imunizados com a LevRad associada ao fluconazol (InRadMed) e analisados 60 e 120 dias após infecção. Os animais que não sofreram qualquer intervenção (C-) e os infectados com o fungo virulento não irradiado (C+) foram utilizados como controle. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica nos pulmões dos animais de cada grupo (n=5 animais) normalizada em relação à  $\beta$  - actina . Foi considerado um aumento de duas vezes como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-).

FIGURA 45 - Expressão relativa de iNOS nos pulmões dos camundongos infectados e tratados.



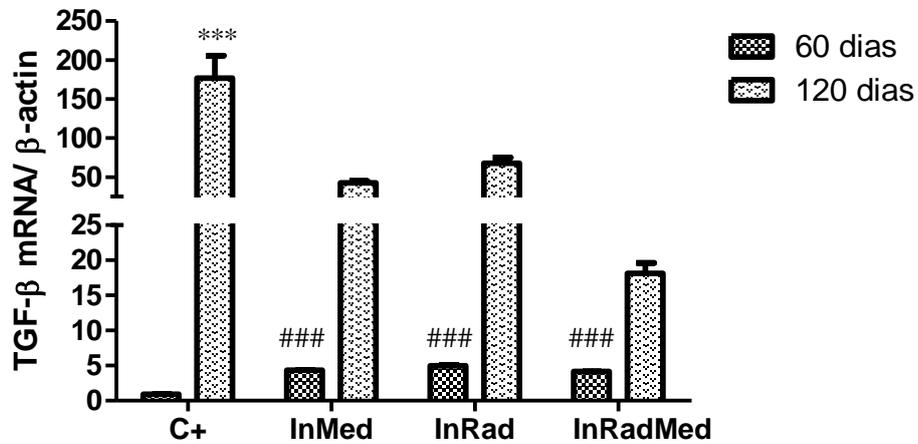
**Legenda:** Os animais infectados com o fungo não irradiado (Pb18) foram tratados com o fluconazol (InMed), imunizados com a LevRad (InRad) ou imunizados com a LevRad associada ao fluconazol (InRadMed) e analisados 60 e 120 dias após infecção. Os animais que não sofreram qualquer intervenção (C-) e os infectados com o fungo virulento não irradiado (C+) foram utilizados como controle. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica nos pulmões dos animais de cada grupo (n=5 animais) normalizada em relação à  $\beta$  - actina. Foi considerado um aumento de duas vezes como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-).

FIGURA 46 - Expressão relativa de TNF- $\alpha$  nos pulmões dos camundongos infectados e tratados.



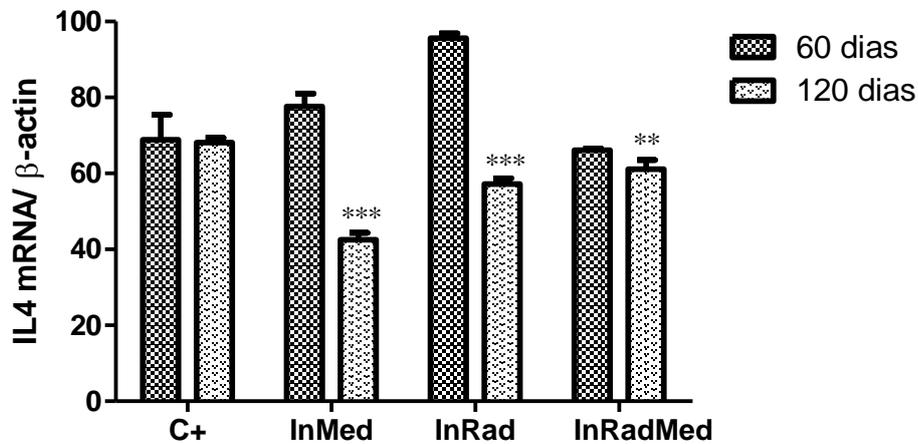
**Legenda:** Os animais infectados com o fungo não irradiado (Pb18) foram tratados com o fluconazol (InMed), imunizados com a LevRad (InRad) ou imunizados com a LevRad associada ao fluconazol (InRadMed) e analisados 60 e 120 dias após infecção. Os animais que não sofreram qualquer intervenção (C-) e os infectados com o fungo virulento não irradiado (C+) foram utilizados como controle. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica nos pulmões dos animais de cada grupo (n=5 animais) normalizada em relação à  $\beta$  - actina . Foi considerado um aumento de duas vezes como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-).

FIGURA 47 - Expressão relativa de TGF- $\beta$  nos pulmões dos camundongos infectados e tratados.



**Legenda:** Os animais infectados com o fungo não irradiado (Pb18) foram tratados com o fluconazol (InMed), imunizados com a LevRad (InRad) ou imunizados com a LevRad associada ao fluconazol (InRadMed) e analisados 60 e 120 dias após infecção. Os animais que não sofreram qualquer intervenção (C-) e os infectados com o fungo virulento não irradiado (C+) foram utilizados como controle. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica nos pulmões dos animais de cada grupo (n=5 animais) normalizada em relação à  $\beta$  - actina . Foi considerado um aumento de duas vezes como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-).

FIGURA 48 - Expressão relativa de IL-4 nos pulmões dos camundongos infectados e tratados.



**Legenda:** Os animais infectados com o fungo não irradiado (Pb18) foram tratados com o fluconazol (InMed), imunizados com a LevRad (InRad) ou imunizados com a LevRad associada ao fluconazol (InRadMed) e analisados 60 e 120 dias após infecção. Os animais que não sofreram qualquer intervenção (C-) e os infectados com o fungo virulento não irradiado (C+) foram utilizados como controle. Os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica nos pulmões dos animais de cada grupo (n=5 animais) normalizada em relação à  $\beta$  - actina. Foi considerado um aumento de duas vezes como um limiar para determinar o gene diferencialmente expresso em relação ao calibrador (C-).

#### 5.4.6 Sumário dos resultados

- Houve diminuição significativa de UFCs nos órgãos (pulmão, baço e fígado) dos camundongos imunizados (LevRad), imunizados e tratados (InRadMed) e apenas tratados com o fluconazol (InMed), analisados 60 dias após infecção, em relação ao C+. O número de colônias em InRadMed foi significativamente menor que em InRad e InMed.
- Os camundongos imunizados (LevRad) ou apenas tratados com o fluconazol (InMed), foram capazes de reduzir para quantidades mínimas o número de UFCs no pulmão dos camundongos BALB/c previamente infectados com uma amostra virulenta de *P. brasiliensis*, 120 dias após infecção. Não houve recuperação de UFCs no baço e fígado desses animais.
- Em InRadMed não foram observadas UFCs em nenhum dos órgãos (pulmão, baço e fígado) dos camundongos BALB/c previamente infectados com uma amostra virulenta de *P. brasiliensis*, analisados 120 dias após infecção.
- No pulmão dos animais dos grupos InRad e InMed analisados 60 dias após infecção foi observado a presença de lesão granulomatosa bem organizada focal e discreta com poucas células fúngicas que foi resolvida 120 dias depois. Não houve alterações histopatológicas dignas de notas nos demais órgãos (fígado e baço) analisados 60 e 120 dias após infecção.
- Não foram observadas alterações histopatológicas em nenhum dos órgãos (pulmão, baço e fígado) dos animais do grupo InRadMed analisados 60 e 120 dias após infecção.
- A imunização com a LevRad induziu a produção significativa de IgG anti-Mexo em relação a C+, InMed e InRadMed.
- Após 60 dias de infecção, foi observada a produção significativa de alto níveis de IgG1 anti-Mexo em todos os grupos analisados (C+, InMed, InRad e InRadMed) em relação C- e ao demais isotipos (IgG2a, IgG2b e IgG3). Os níveis de IgG1 só não foram significativos em relação aos níveis de IgG2a e IgG2b em InRad e IgG2b em InRadMed.
- Houve produção elevada de IgG2a e IgG2b em InRad e IgG2b em InRadMed, 60 e 120 dias após infecção.

- Os resultados referentes à quantificação relativa das citocinas, por PCR em tempo real, revelaram a expressão elevada de IFN- $\gamma$ , iNOS e TGF- $\beta$  e a baixa de IL-4 e IL-10 nos pulmões dos animais InRad, InRadMed e InMed analisados 120 dias após infecção.

A imunização com a LevRad associada ao tratamento com o fluconazol desencadeou resposta imune protetora com envolvimento predominante do perfil TH1. Essa estratégia terapêutica foi capaz de realçar o efeito antifúngico apresentado pelo fluconazol, apesar do curto período de tratamento. Os resultados deste trabalho demonstram o grande potencial do uso da LevRad na formulação de uma vacina anti-*P.brasiliensis* protetora e capaz de reduzir os efeitos de morbidade associados à PCM.

**VI. DISCUSSÃO**

---

A paracoccidiodomicose (PCM) é a micose sistêmica mais prevalente nos países da América Latina. No Brasil, ela é considerada a oitava causa de mortalidade por doença infecciosa predominantemente crônica entre as doenças infecciosas e parasitárias. Inclusive a PCM apresenta maior índice de mortalidade que a causada por leishmaniose e a mais alta taxa entre as micoses sistêmicas (Coutinho, 2002). Recentemente, foi incluída na lista das doenças negligenciadas, cujo impacto na saúde pública não foi quantificado devido à falta de dados disponíveis (Martinez, 2010).

A doença, endêmica em regiões rurais e suburbanas, se manifesta como uma pneumopatia de curso crônico, comumente associada a lesões na pele e mucosas e, eventualmente, lesões extra-pulmonares disseminadas. Frequentemente, o paciente pode apresentar seqüelas incapacitantes em consequência da fibrose pulmonar, resultante do processo inflamatório desenvolvido em resposta ao fungo patogênico (BRUMMER *et al.*, 1993). Além disso, a doença representa um agravo de saúde no Brasil devido às mortes prematuras que acometem, principalmente, os trabalhadores rurais na sua fase mais produtiva da vida.

Até o momento não existem vacinas eficazes contra a PCM ou contra qualquer outra micose de importância médica. E, embora o tratamento quimioterápico tenha se mostrado eficiente em reduzir a intensidade da infecção por *P. brasiliensis*, problemas relacionados ao longo período de medicação (particularmente os sulfonamídicos), aos efeitos nefrotóxicos da anfotericina B associados a outros efeitos indesejáveis, a resistência dos microrganismos aos anti-fúngicos e aos altos custos desses medicamentos (azoles e formulação lipídica da anfotericina B) têm estimulado a busca de estratégias profiláticas e/ou terapêuticas eficazes para o controle da PCM. Além disso, considerando o aumento na incidência mundial de infecções fúngicas, o desenvolvimento de novas terapias tornou-se de grande importância para a saúde pública (CHAKRABARTI, 2005).

Considerando o exposto acima, células leveduriformes de *P. brasiliensis* atenuadas por irradiação gama (LevRad) têm sido avaliadas não somente quanto a sua capacidade em induzir uma imunidade protetora nas diferentes fases da infecção, mas também de reduzir a morbidade através da eliminação dos focos latentes do fungo ou da modulação da resposta granulomatosa.

Para isso, células leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis* foram atenuadas por radiação gama no laboratório de irradiação gama do Centro de

---

Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear CDTN/CNEN. Foi determinada uma dose a qual o patógeno perde a sua capacidade de se multiplicar, mas mantém a viabilidade, síntese e secreção de proteínas, a atividade metabólica e o perfil antigênico (DEMICHELI *et al.*, 2006). Demonstramos, principalmente, a atividade protetora da LevRad em camundongos BALB/c imunizados pela via intravenosa (i.v), contra formas altamente virulentas do *P. brasiliensis*.

Neste trabalho foi avaliado o efeito protetor da LevRad frente ao fungo patogênico, *P. brasiliensis*, em ensaios *in vitro* e em animais imunizados desafiados, por via intratraqueal, com as formas altamente virulentas do fungo. O potencial imunoterapêutico da LevRad em associação ou não ao fluconazol também foi avaliado em uma vacinação terapêutica.

O potencial da irradiação ionizante como uma ferramenta eficiente para a criação de vacinas atenuadas altamente eficazes tem sido reconhecido desde a década de 50 (WALLES E KUSEL, 1992). A grande vantagem atribuída a esse tipo de imunização esta relacionada à capacidade dos microrganismos atenuados apresentarem seus antígenos seqüencialmente ao hospedeiro e poderem até mesmo sintetizar antígenos que só são produzidos durante a infecção. Como em uma infecção natural, eles são capazes de desencadear uma resposta imune protetora duradoura, mas sem o risco de uma infecção progressiva (HIRAMOTO *et al.*, 2002). Contudo, vários cuidados devem ser tomados durante o estudo de uma vacina constituída de microrganismo vivo. Entre eles, destacam-se a preocupação com a estabilidade da perda da virulência e, no caso de micoses profundas, a garantia da eliminação do microrganismo vivo atenuado pelo hospedeiro, pois caso contrário podem se formar focos de reativação da doença (DEEPE, 1997). Esses riscos podem limitar a utilização da vacina caso estudos criteriosos de virulência e proteção não forem realizados em modelos animais. A instabilidade nas preparações e a toxicidade são outros problemas que demandam cuidados especiais quanto ao controle de qualidade das formulações. Esses problemas foram minimizados neste trabalho, primeiramente, pelo uso da irradiação gama para a atenuação das leveduras. Doses adequadas de irradiação ionizante causam extensa fragmentação da dupla fita de DNA, dificultando com isso os mecanismos de reparo das células, o que conduz a uma perda irreversível da capacidade reprodutiva e da virulência das células fúngicas (FRANKENBERG *et al.*, 1981; RHIND *et al.*, 1998).

---

Em segundo lugar, a perda da infectividade da LevRad, demonstrada em estudos preliminares (DEMICHELLI *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2007), foi novamente avaliada em camundongos imunocompetentes (BALB/c) e imunodeprimidos (Nude e BALBc\*) analisados 30 e 90 dias após a infecção, por via intratraqueal e endovenosa, a partir da determinação das unidades formadoras de colônias (UFCs) e análise histopatológica.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a perda da infectividade, uma vez que nenhuma colônia foi recuperada dos órgãos dos camundongos BALB/c e BALBc\* 30 e/ou 90 dias após a infecção. Mesmo nos camundongos Nude, que são destituídos de timo e, portanto, não apresentam imunidade dependente de célula T, não houve recuperação de colônias após 30 dias. Os camundongos Nude infectados com as células leveduriformes de *P. brasiliensis* virulento não irradiado (Pb18) morreram dentro dos cinco primeiros dias após infecção, enquanto os camundongos Nude inoculados com a LevRad permaneceram vivos por 30 dias, quando foram submetidos à eutanásia. Esses resultados foram consolidados através do ensaio histopatológicos, onde não foram observadas lesões em nenhum dos órgãos analisados dos camundongos infectados com a LevRad. A perda da infectividade foi novamente evidenciada *in vitro* a partir dos sobrenadantes de cultura obtidos do lisado de macrófagos peritoneais pré-ativados, desafiados com a LevRad e cultivados por 15 a 20 dias em meio BHI-ágar suplementado, uma vez que não houve recuperação de colônias.

Após comprovada a perda da capacidade infecciosa da LevRad, o potencial imunogênico do fungo irradiado em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c normais e imunizados foi avaliado a partir de ensaios para determinar a atividade fagocítica, a capacidade fungicida, a concentração do óxido nítrico (NO) e secreção de citocinas. Para isso, macrófagos peritoneais foram extraídos de camundongos BALB/c normais e imunizados e cultivados em meio RPMI-C pré-ativados ou não com o IFN- $\gamma$  recombinante e, posteriormente, desafiados ou não com a LevRad ou com o fungo não irradiado.

O contato inicial entre o *P. brasiliensis* e o hospedeiro se faz por meio das células fagocíticas, que atuam como um importante membro da defesa inata do organismo. Os macrófagos representam a principal célula de defesa contra *P. brasiliensis*. O fungo internalizado se multiplica em monócitos e macrófagos não ativados. A ativação precoce de macrófagos a partir de IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  garante a

---

eliminação eficiente do fungo através da fagocitose, da ação de citocinas pró-inflamatórias e da atividade microbicida do NO contra o *P. brasiliensis*.

Os resultados obtidos mostraram o potencial imunogênico da LevRad caracterizado pela capacidade de estimular precocemente a atividade fagocítica, a produção de NO e a secreção de altos níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 por macrófagos peritoneais extraídos de camundongos BALB/c normais e imunizados. A eficiência na eliminação do fungo foi observada em macrófagos obtidos de camundongos imunizados que foram desafiados em cultura com o Pb18 não irradiado.

Em resumo, a imunização com a LevRad parece ter favorecido a ativação dos macrófagos peritoneais pela ação TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e conseqüente eliminação fúngica dependente de NO.

Em seguida, a eficácia da vacinação profilática foi avaliada em camundongos BALB/c imunizados duas ou três vezes consecutivas com a LevRad, pelas vias intravenosa (i.v.) e subcutânea (s.c.), sem o uso de adjuvantes, 30 e 90 dias após o desafio intratraqueal (i.t.) com o *P. brasiliensis* não irradiado (Pb18). As diferentes vias e o número de imunização foram avaliados a fim de se verificar possíveis alterações no perfil da resposta imunológica.

Os resultados demonstraram que a LevRad foi capaz de desencadear proteção potente, principalmente em camundongos imunizados três vezes consecutivas, i.v. e s.c., após o desafio i.t. com o Pb18, já que a recuperação de unidades formadoras de colônias nos órgãos (pulmão, baço e fígado) analisados foi significativamente menor em relação ao controle positivo.

Os animais imunizados duas vezes consecutivas pela via subcutânea (Sub2X) analisados 30 dias após o desafio i.t. com o Pb18 não irradiado apresentaram PCM pulmonar localizada, enquanto os animais imunizados pela via endovenosa apresentaram PCM disseminada branda em relação ao controle positivo. Após 90 dias, os camundongos foram capazes de eliminar o fungo e controlar a infecção. Os animais imunizados três vezes consecutivas s.c. (Sub3x) foram resistentes à PCM, enquanto os animais imunizados três vezes consecutivas i.v. (End3x) desenvolveram, inicialmente, PCM restrita aos pulmões que também foi controlada 90 dias depois. O alto nível de proteção verificado após um período prolongado de exposição ao fungo virulento não irradiado é um aspecto relevante na proteção contra a PCM devido à alta capacidade de reativação de focos quiescentes do fungo patogênico. Segundo Brummer e

---

colaboradores (1993), é comum o indivíduo desenvolver a doença mais de uma década depois de abandonar uma região endêmica.

Os resultados obtidos no presente trabalho foram confirmados em ensaios histopatológicos, os quais mostraram a presença de tecidos saudáveis sem a formação de lesões granulomatosas e presença de células fúngicas, caracterizando um quadro de infecção controlada provavelmente devido à ativação precoce da imunidade inata e dos mecanismos efetores da imunidade celular e humoral.

O efeito protetor conferido pela LevRad já havia sido observado em experimentos anteriores realizados em condições semelhantes, porém utilizando vias de infecção/desafio diferentes (via endovenosa). Martins e colaboradores (2007) demonstraram uma proteção eficiente desenvolvida pelos camundongos imunizados duas vezes consecutivas com a LevRad e desafiados pela via endovenosa com o *P. brasiliensis* não irradiado. A imunização foi capaz de reduzir a infecção inicial e desencadear uma proteção de 99,5% em camundongos analisados 90 dias após desafio.

A avaliação da resposta humoral desencadeada pela imunização com a LevRad foi primeiramente avaliada, por ELISA, nos soros dos camundongos coletados antes (P0) e 15 (P15), 30 (P30) e 45 (P45) dias após a primeira imunização

A imunização endovenosa (End3x) foi capaz de ativar eficientemente a resposta humoral. Inicialmente, a concentração de anticorpos específicos presentes no soro era baixa e, após uma fase de latência, houve produção de altos níveis de IgG anti-Mexo. Os animais imunizados duas ou três vezes pela via subcutânea (Sub3x) reconheceram de forma significativa o antígeno Mexo, mas apresentaram reatividade inferior em relação ao End3x.

Os animais imunizados com a LevRad, pela via endovenosa ou subcutânea, apresentaram produção elevada de IgG anti-Mexo 30 dias após o desafio e, baixos níveis 90 dias depois, onde também foi observado a eliminação do fungo e o controle da infecção.

Não houve diferença significativa quanto aos níveis de IgG1 produzidos em resposta ao antígeno do fungo (Mexo) presentes nos soros dos animais infectados (C+) e animais imunizados analisados 30 dias após o infecção/desafio. Porém, em End3x os altos níveis de IgG1 foram associados à produção significativa de IgG2a e IgG2b provavelmente devido ao aumento de citocinas que favorecem o “switching” para esses isotipos.

---

A influência de diferentes citocinas na produção de anticorpos e expressão de isotipos já foi bem documentada (SNAPPER & PAUL, 1987; ESSER & RADBRUCH, 1990; FINKELMAN *et al.*, 1990). IFN-  $\gamma$  é o principal indutor da secreção de IgG2a (BANCHEREAU & ROUSSET, 1992), enquanto IL-4 tem sido associada à produção de IgG1 em camundongos e TGF- $\beta$  é um importante indutor da secreção de IgG2b. Além disso, IFN-  $\gamma$  induz a secreção de IgG3 em resposta a antígenos independentes de células-T (SNAPPER *et al.*, 1992)

Os altos níveis de IgG presentes nos soros dos animais imunizados frente ao antígeno Mexo, produzidos provavelmente devido ao grande número de epítomos lineares de linfócitos B e T inclusos em um patógeno atenuado, sugerem a possível participação de anticorpos específicos da LevRad no controle da infecção.

O papel da imunidade mediada por anticorpos na resistência do hospedeiro ao *P. brasiliensis* tem sido explorada. Mattos Grosso e colaboradores (2003) foram os primeiros a demonstrar a possibilidade de proteção mediada por anticorpos anti-gp70, reconhecido em 96% dos soros de pacientes com PCM. Xander e colaboradores (2007), mostraram recentemente que um anticorpo que reconhecia a proteína secretada de 75-kDa com atividade fosfatase inibiu o crescimento de *P. brasiliensis in vitro* e reduziu o número de UFCs no pulmão de animais infectados *in vivo*. Além disso, os anticorpos anti-gp43 apresentaram ação protetora não em relação ao crescimento do fungo, mas associada à capacidade fagocítica (BUISSA-FILHO *et al.* 2008).

Em adição, apesar de a imunidade celular ser considerada o principal mecanismo de defesa envolvido na paracoccidiodomicose, a produção de certos isotipos do anticorpo IgG, tal como IgG2a (CALICH, 1998), exercem um importante papel no estabelecimento da proteção. Os mecanismos de ação dos anticorpos no combate a infecções incluem a neutralização de antígenos, o aumento da fagocitose e da toxicidade mediada por células, a ativação do complemento, a inibição do crescimento, aderência, ou efeitos antimicrobianos diretos (RESTREPO & MORENO, 1993; BUISSA-FILHO *et al.*, 2008).

A resposta imune celular desencadeada pela LevRad também foi avaliada em ensaios de proliferação celular e, através da determinação do perfil de citocinas.

O extrato do fungo irradiado (ePb18\*) foi capaz de induzir a proliferação dos esplenócitos dos camundongos BALB/c previamente imunizados pela via endovenosa com a LevRad. ePb18\* estimulou duas vezes mais a proliferação dos esplenócitos de

---

animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa do que os imunizados duas vezes. A proliferação celular dos esplenócitos obtidos 30 dias após a infecção desafio dos animais previamente imunizados três vezes consecutivas tanto pela via endovenosa quanto pela via subcutânea, em resposta ao ePb18\*, também foi evidente. Esses resultados sugerem a participação do ePb18\* nos estágios iniciais da resposta imune, conferindo resistência ao hospedeiro, e contribuindo para o desenvolvimento eficaz da resposta imune mediada por células T contra o *P. brasiliensis*.

A expressão das citocinas nos pulmões dos animais apenas imunizados com a LevRad ou imunizados e, posteriormente desafiados com o *P. brasiliensis* virulento não irradiado foram quantificadas por PCR em tempo real. Citocinas secretadas também foram dosadas por ELISA em resposta a LevRad.

As citocinas representam um importante papel na regulação da resposta imune (SNAPPER *et al.*, 1997). Na PCM experimental, o perfil Th1 está relacionado com a produção de citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , as quais estimulam a resposta imune mediada por células, com a ativação de macrófagos e linfócitos T (CALICH *et al.*, 1998; CANO *et al.*, 1987; KASHINO *et al.*, 2000). Enquanto, o perfil Th2 favorece a produção preferencial de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 e o desencadeamento de uma resposta humoral, não essencialmente protetora na PCM (CALICH *et al.*, 1998; CANO *et al.*, 1987; KASHINO *et al.*, 2000). Entretanto, o sucesso da interação entre o hospedeiro e o fungo patogênico não depende, necessariamente, do desenvolvimento de padrões totalmente polarizados de resposta TH1 e TH2, mas sim do balanço entre a produção de citocinas pro- e anti-inflamatórias (PARISE-FORTES *et al.*, 2011). Dependendo do grau de resposta inflamatória provocada pela resposta TH1, as citocinas anti-inflamatórias são essenciais para o equilíbrio e geração de resposta imune protetora adequada (TRAVASSOS *et al.*, 2008).

LevRad estimulou expressão precoce e elevada de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4 em animais imunizados duas vezes consecutivas pela via endovenosa (End2x) e subcutânea (Sub2x), porém nos animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa (End3x) houve expressão elevada de IFN- $\gamma$  e baixa de IL-4 e IL-10. Ao mesmo tempo foi observada a expressão significativa de TNF- $\alpha$  em relação aos demais grupos de animais imunizados. Não houve expressão significativa de citocinas nos animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea (Sub3x). Esse resultado, associados aos descritos anteriormente sobre macrófagos ativados reforçam a hipótese

---

de que a imunização com a LevRad foi capaz de desencadear a ativação precoce de mecanismos imunes que dirigem a resposta preferencialmente para o fenótipo TH1, importante no controle da infecção.

Um padrão misto TH1/TH2 de ativação caracterizada pela expressão elevada de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e a baixa de IL-10 e TGF- $\beta$  foi observado 90 dias após a infecção desafio dos animais imunizados três vezes consecutivas, pela via endovenosa e subcutânea. O efeito protetor conferido pela LevRad parece estar associado a expressão elevada de IFN- $\gamma$ . O equilíbrio estabelecido nesse padrão misto de resposta provavelmente intensificou a atividade fungicida e a eliminação do fungo. O mesmo perfil de resposta foi observado no sobrenadante de cultura dos esplenócitos estimulados ou não *in vitro* com a LevRad, porém as diferenças entre os níveis de citocinas produzidas foram observadas logo após o desafio com o fungo não irradiado (30 dias).

Como já documentado, o IFN- $\gamma$  exerce um papel relevante na resistência do hospedeiro à infecção pelo *P. brasiliensis* devido a sua capacidade de ativar macrófagos a eliminar o fungo, favorecendo com isso a não disseminação e progressão da doença (CANO *et al.*, 1998). A depleção de IFN- $\gamma$  em camundongos suscetíveis ou resistentes usando anticorpos monoclonais anti-IFN- $\gamma$  exacerbou a infecção pulmonar, com disseminação precoce do fungo para outros tecidos (CANO *et al.*, 1998). Além disso, o IFN- $\gamma$  estimula a secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos. Os altos níveis destas duas citocinas agem sinergicamente na ativação da resposta imune (MAMONI *et al.*, 2005) através da formação do granuloma e produção de óxido nítrico (GONZALEZ *et al.*, 2000).

Curiosamente, os animais imunizados três vezes consecutivas pela via endovenosa e desafiados com o fungo virulento não irradiado, os quais têm respondido com eficiência ao estímulo da LevRad, não expressaram de forma significativa a enzima iNOS. Ao contrário, a expressão elevada dessa enzima foi observada em resposta a LevRad nos animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea, analisados 90 dias após desafio.

Várias evidências mostram o papel fundamental do NO na atividade fungicida de macrófagos ativados (CASADEVALL, 1998; GONZALEZ, 2000). Entretanto, Brummer e colaboradores (1998) demonstraram que os macrófagos peritoneais de

---

camundongos ativados pelos IFN- $\gamma$  apresentaram elevada capacidade fungicida, mas a morte do fungo foi independente do metabolismo oxidativo. Além disso, Gonzales e colaboradores (2004) mostraram que macrófagos peritoneais ativados pelo TNF- $\alpha$ , sem a produção de NO, foram capazes de inibir a transição micélio-levedura do *P. brasiliensis*. Em adição, experimentos realizados com camundongos deficientes de NO, tratados com a lectina KM<sup>+</sup>, apresentaram resposta protetora independente da produção de NO (COLTRI, 2008).

Em síntese, os animais imunizados três vezes responderam de forma mais eficiente à invasão do fungo do que os imunizados duas vezes consecutivas. No geral, não houve diferença significativa em relação à proteção estabelecida pela LevRad em animais imunizados três vezes consecutivas pela via subcutânea ou endovenosa. A imunização intravenosa foi capaz de estimular resposta imune protetora, como evidenciada pela expressão precoce de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e indução da proliferação dos esplenócitos *in vitro* em resposta aos estímulos antigênicos. Houve ativação efetiva da resposta humoral, com a produção inicial de altos níveis de anticorpos IgG e seu isotipos protetores, IgG2a e IgG2b, os quais apresentaram aumentados 30 dias após a infecção desafio e diminuíram 90 dias depois com a eliminação do fungo. A ativação da resposta celular, 90 dias após o desafio dos animais imunizados, foi caracterizada pela expressão elevada de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, e baixa de IL-10, TGF- $\beta$  e iNOs.

Ao contrário, Magalhães e colaboradores (2011) demonstraram diferenças quanto a redução da carga fúngica e ao estabelecimento da resposta imune dependente da via de imunização (endovenosa ou subcutânea) em vacinação profilática. Enquanto os animais imunizados s.c. com o P10 associado às células dendríticas apresentaram baixa carga fúngica pulmonar e resposta imune com perfil TH1, os animais imunizados i.v. foram sensíveis ao desafio com o fungo virulento e desenvolveram doença similar aos animais infectados.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram o potencial da LevRad em induzir resposta imune protetora eficiente e duradoura contra amostras altamente virulenta do *P. brasiliensis*.

O potencial da vacinação terapêutica também foi avaliado 60 e 120 dias após a infecção i.t. com o Pb18 não irradiado, em camundongos BALB/c tratados com o fluconazol (InMed), imunizados com a LevRad (InRad) e imunizados com a LevRad associado ao tratamento com fluconazol (InRadMed).

---

O fluconazol foi o medicamento escolhido para a realização deste trabalho por apresentar atividade significativa em PCM humana, sendo usado mais comumente em casos de envolvimento do sistema nervoso central pelo fungo (VISBAL *et al.*, 2005). Além disso, esse medicamento apresentou eficiência, em estudos anteriores, no tratamento de camundongos infectados com o *P. brasiliensis* (MARQUES *et al.*, 2006). Em adição, trata-se de um medicamento solúvel em água o que facilitou a sua administração pela via intraperitoneal nos animais.

Os resultados deste trabalho mostraram o efeito aditivo da imunização com a LevRad associada ao tratamento com o fluconazol (grupo InRadMed) contra as células altamente infecciosa de *P. brasiliensis*. Essa estratégia terapêutica foi capaz de restringir a infecção ao pulmão dos animais analisados 60 dias após infecção, evitando a sua disseminação para o baço e o fígado. Após 120 dias, não foram observadas UFCs em nenhum dos órgãos analisados, destacando o controle da infecção. Os ensaios histopatológicos confirmaram esses resultados mostrando os órgãos preservados e livres de carga fúngica.

É consenso na literatura que a resistência à infecção fúngica é determinada principalmente pela habilidade do hospedeiro restringir a infecção no seu sítio primário de infecção, evitando com isso a disseminação fúngica e a resolução rápida da doença (CANO *et al.* 2005).

Redução significativa de UFCs foram observadas tanto nos pulmões dos animais infectados e, posteriormente imunizados com a LevRad (InRad) quanto no tratados com o fluconazol (InMed) em relação ao controle positivo (C+). Os pulmões dos animais dos grupos InRad e InMed apresentaram lesão granulomatosa bem organizada, focal e discreta, com pequeno número de células leveduriformes. Não foram observadas alterações nos demais órgãos analisados (fígado e baço).

A imunização com a LevRad foi efetiva, mas em princípio não apresentou benefícios em relação ao tratamento com o fluconazol. Entretanto, é importante considerar que os animais infectados foram submetidos a apenas duas imunizações consecutiva, intervalo de 15 dias cada, com a LevRad, sem o uso de adjuvantes, enquanto o fluconazol foi administrado por 30 dias consecutivos. Além disso, os animais do grupo InRad foram primeiramente avaliados 15 dias após a suspensão medicamentosa enquanto os InMed foram avaliados logo após a sua suspensão.

Os camundongos infectados imunizados com LevRad (InRad) mostraram expressão precoce e elevada (60 dias após a infecção) de TNF- $\alpha$ , a qual pode ter contribuído para a diminuição das UFCs, resolução da lesão granulomatosa e, conseqüentemente controle da infecção, como observado no grupo InRadMed.

TNF- $\alpha$  é uma citocina TH1 que, de acordo com trabalhos anteriores, tem grande importância no controle da disseminação e do crescimento do fungo, e na resposta inflamatória em PCM (SOUTO *et al.*, 2000). De fato, a reação inflamatória granulomatosa, uma resposta tecidual especializada e eficiente contra certos parasitas (ADAMS, 1976), entre eles *P. brasiliensis*, requer TNF- $\alpha$  que é supostamente responsável por atrair e ativar células efetoras, assim como pelo acúmulo e diferenciação de macrófagos (TRACEY & CERAMI, 1993). A ativação precoce e eficiente da resposta imunológica inata é fundamental na fase inicial da infecção e determina o tipo de resposta adaptativa que será desencadeada contra o fungo (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997, 2000).

Após 120 dias de infecção, foi observada expressão elevada de IFN- $\gamma$ , iNOS e TGF- $\beta$  e baixa de IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  nos grupos InRad e InRadMed, caracterizando o estabelecimento predominante de um perfil TH1 de resposta. Ao mesmo tempo, foi observada a resolução da doença em InRadMed e uma notável diminuição no número de UFCs e das lesões histopatológicas em InRad e InMed, ocorridas provavelmente como conseqüência do equilíbrio adequado estabelecido entre a resposta imune predominantemente TH1 e a resposta menos intensa TH2.

Como mencionado anteriormente, IFN- $\gamma$  desempenha um papel importante na resistência do hospedeiro à infecção pelo *P. brasiliensis* através da eliminação eficiente de células fúngicas por macrófagos ativados, regulação da resposta imune mediada por células e os seus efeitos reguladores sobre respostas imunes humorais específicas (GONZALEZ *et al.*, 2000). NO tem demonstrado ser um potente microbicida e a sua secreção está geralmente associada a eliminação do fungo e proteção do hospedeiro (GONZALEZ *et al.*, 2000; SOUTO *et al.*, 2000; TSUNAWAKI *et al.*, 1988). Em relação ao TGF- $\beta$ , a expressão elevada verificada tardiamente pode ter favorecido a regulação da resposta inflamatória induzida pelas citocinas pró-inflamatórias (PARISE-FORTES *et al.*, 2006; PARISE-FORTES *et al.*, 2011; CASSONE, 2008).

O efeito terapêutico de imunógenos antigênicos do *P. brasiliensis* foi também explorado em trabalhos anteriores utilizando drogas antifúngicas associadas ou não ao

peptídeo P10 para o tratamento de animais BALB/c com PCM experimental. Os resultados demonstraram que a P10 associada aos diferentes antifúngicos e a Anfotericina B foi capaz de reduzir 60 a 80% no número de UFCs no pulmão desses animais quando comparados ao controle positivo e ao controle adjuvante. Porém, não houve diminuição significativa de colônias no fígado e baço destes animais (MARQUES *et al.*, 2006). Marques e colaboradores (2008) também demonstraram o efeito protetor aditivo da P10 associada ao Itraconazol e a sulfonamida em animais anérgicos.

Fernandes e colaboradores (2011) demonstraram o grande potencial do uso combinado das proteínas Pb27r e Pb40r na formulação de uma vacina terapêutica para ser utilizada em conjunto com quimioterápicos no tratamento da PCM.

Em resumo, a alta expressão de IFN- $\gamma$ , iNOS e TGF- $\beta$  e a baixa de IL-4 e IL-10 observada 120 dias após infecção, associada a alta produção de IgG2a e IgG2b, bem como, a diminuição da carga fúngica, ausência de lesões histopatológicas e a baixa taxa de mortalidade sugerem fortemente o envolvimento da resposta imune TH1 dependente de IFN-  $\gamma$  no efeito protetor conferido pela LevRad. Demonstrando o grande potencial do uso da LevRad na formulação de uma vacina anti-*P.brasiliensis* protetora e capaz de reduzir os efeitos de morbidade associados à PCM.

**VII CONCLUSÃO**

Os resultados apresentados neste trabalho confirmam o potencial imunogênico da LevRad *in vitro* e ressaltam o potencial do uso da LevRad em uma formulação anti-*P. brasiliensis* protetora capaz de evitar o estabelecimento da doença ou reduzir os efeitos de morbidade associados à PCM.

**VIII PERSPECTIVAS**

- Estudar componentes da levedura radioatenuada de *P. brasiliensis* (proteínas secretadas ou de parede), que podem estar associados à indução da resposta imune protetora.
- Verificar a ausência de toxicidade da preparação da LevRad para viabilizar a utilização da vacina contra *P. brasiliensis* em humanos.
- Utilizar a mesma metodologia de atenuação por irradiação gama no desenvolvimento de vacinas para fungos de importância veterinária.

**XIX REFERÊNCIAS**

- 1 ABO-SHEHAD, M. N., AL. ZUBAIDY, B. A.; HERBERT, I. V. Acquired immunity to *Toxocara canis* infection in mice. **Veterinary Parasitology.**, v. 38, p. 289- 298, 1991.
- 2 ADAMS, D. O. The granulomatous inflammatory response. **American Journal of Pathology**, v. 84, p. 164-191, 1976.
- 3 AGYEI-FREMPONG, M.; CATTY, D. The measurement of antigens released by radiation-attenuated *Trichinella spiralis* larvae. **Parasite Immunology.**, v.5, p.289-303, 1983.
- 4 AJELLO, L.; POLONELLI, L. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. **European Journal of Epidemiology.**, v.1, p.160-165, 1985.
- 5 ALMEIDA, F. O. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos do Brasil – novo gênero para o parasita brasileiro. **An. Fac. Méd. Univ. de São Paulo**, v.5, p. 125-134, 1930.
- 6 AMARAL, A. C. *et al.* Poly (lactic acid-glycolic acid) nanoparticles markedly improve immunological protection provided by peptide P10 against murine paracoccidioidomycosis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 159, p. 1126-32, 2010.
- 7 ANDRADE, T. C. B. *et al.* BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis: **review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, p. 459-465, 2005.
- 8 ARRUDA, C. *et al.* Dual role of interleukin-4 (IL4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 3932-3940, 2004.
- 9 ARRUDA. C. *et al.* Aseptic cure of pulmonary paracoccidioidomycosis can be achieved after previous subcutaneous immunization of susceptible but not resistant mice. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 704-713, 2007.
- 10 BAGAGLI, E. *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 505-512, 1998.
- 11 BAIDA, H. *et al.* Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v. 1, p. 273-278, 1999.
- 12 BARBOSA, M. S. *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 382-389, 2005.

- 13 BAVA, A. J. *et al.* Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycoses patients. **Microbiol. Immunol.**, v. 35, p. 167-174, 1991.
- 14 BAZAN, C. *et al.* Fungal infections of the brain. **Neuroimaging Clinics of North America**, v. 1, p. 57-67, 1991.
- 15 BOGLIOLO, L. **Patologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. 1097 p.
- 16 BONETTI, F. C. *et al.* Aspectos morfológicos da *Leishmania amazonensis* submetida à ação da radiação ionizante. In: International nuclear atlantic conference; brazilian national meeting on nuclear applications, 6, Rio de Janeiro, 2002. **Proceedings**... Rio de Janeiro: ABEN, 2002. p.3080-3086. (CD-ROM).
- 17 BORGES-WALMSLEY, M. I., CHEN, D., SHU, X.; WALMSLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol.**, v. 10, p. 80-7, 2002.
- 18 BRADFORD, M. A. rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- 19 BRAGA, C. J. M. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43- derived P10 sequence and the Salmonella entérica Flic flagellin. **Infection and immunity**, v. 77, p.1700-1707, 2009.
- 20 BRUMMER, E. *et al.* Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: The influence of in vitro passage and storage. **Mycopathologia**, v. 109, p. 13-17, 1990.
- 21 BRUMMER, E., CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 89-117, 1993.
- 22 BUISSA-FILHO, E. *et al.* The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 3321-3328, 2008.
- 23 BURGER, E. *et al.* Paracoccidioides brasiliensis infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T-dependent and T-independent components. **Amer J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 391-398, 1996.
- 24 BUSTAMANTE-SIMON, B. *et al.* Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of Paracoccidioides brasiliensis. **J. Med.Vet. Mycol.**, v. 23, p. 407-414, 1985.
- 25 CALICH, V. L. G., VAZ, C. A. C.; BURGER, E. PMN chemotatic factor produced by glass-adherent cells in acute inflammation caused by Paracoccidioides brasiliensis. **Brit. J. Exp. Path.**, v. 66, p. 57-60, 1985.

- 26 CALICH, V. L. G. *et al.* Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 66, p. 585-594, 1985.
- 27 CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistance mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 615-623, 1998.
- 28 CALICH, V. L., VAZ, C. A.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res. Immunol.**, v. 149, p. 407-417, 1998.
- 29 CALICH, V. L. *et al.* Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, p. 223-36. 2008.
- 30 CANO, L. E. *et al.* An evaluation of the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for quantitation of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p.127, 1987.
- 31 CANO, L. E. *et al.* Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1777-1783, 1995.
- 32 CANO, L. E. *et al.* Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 800-805, 1998.
- 33 CANO, L. E. *et al.* Depletion of CD8+ T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 68, p.352-359, 2000.
- 34 CARMONA, A. K. *et al.* Characterization of an exocellular serine-thiol proteinase activity in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Biochem J.**, v. 309, p. 209-214, 1995.
- 35 CARRERO, L. L. *et al.* New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet. Biol.**, v.45, p. 605-612, 2008.
- 36 CARRILLO-MUÑOZ, A.J. *et al.* Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Revista Espanhola Quimioterapia**, v. 19, p. 130-139, 2006.
- 37 CASADEVALL A.; PERFECT JR. *Cryptococcus neoformans*. **ASM Press**, 1998.
- 38 CASADEVALL, A. Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? **Fungal Genet. Biol.**, v. 42, p. 98 –106. 2005.

- 
- 39 CASALI, A.K. *et al.* *Cryptococcus neoformans*: Aspectos moleculares e epidemiológicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 20. p. 34-37. 2001.
- 40 CASSONE, A. Fungal vaccines: real progress from real challenges. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 8, p. 114-24, 2008.
- 41 CENCI, E. *et al.* Role of L3T4+ lymphocytes in protective immunity to systemic *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun.*, v. 57, p. 3581-3587, 1989.
- 42 Chakrabarti, A. Microbiology of systemic fungal infections. **J. Postgrad. Med.** v. 51, p. S16-20, 2005.
- 43 CHUSATTAYANOND, W.; DENHAM, D. A. Attempted vaccination of jirds (*Meriones unguiculatus*) against *Brugia pahangi* with radiation attenuated infective larvae. **J. Helminthol.**, v. 60, p. 149-155, 1986.
- 44 CLYDE, D. F. Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies. **Bull WHO**, v. 68, p. 9-12, 1990.
- 45 COLTRI, K.C. *et al.* Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via Interleukin-12 production in a Toll-Like receptor 2-dependent mechanism. **American journal of pathology**. v. 173, p.423-32, 2008.
- 46 COLE, G. T. *et al.* A vaccine against coccidioidomycosis is justified and attainable. **Medical Mycology.**, v. 42, p. 189-216, 2004.
- 47 COULSON, S. P. The radiation-attenuated vaccine against Schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine. **Advances in Parasitology**, v. 39, p. 271-336, 1997.
- 48 COUTINHO, Z. F. *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública**, v. 18, p. 1441-1454, 2002.
- 49 DE BRITO, T.; FRANCO, M. F. Granulomatous inflammation. **Rev Inst Med Trop**, Sao Paulo, v. 36, p. 185-92, 1994.
- 50 DE MATTOS GROSSO, D. *et al.* Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infect Immun.**, v.71, p. 6534-42. 2003.
- 51 DEAN, D. A. Schistosoma and related genera: acquired resistance in mice. **Exp Parasitol.**, v. 1, p. 1-104, 1983.
- 52 DEEP Jr., G. S. Prospects for the development of fungal vaccines. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p. 585-596, 1997.

- 
- 53 DEEP Jr., G. S. Preventative and therapeutic vaccine for fungal infections: from concept to implementation: review. **Expert Rev. Vaccine**, v. 3, p. 1-9, 2004.
- 54 DEL NEGRO, G. Tratamiento de paracoccidioidomicose. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 20, p. 231-234, 1974.
- 55 DEMICHELI, M. C., REIS, B. S., GÓES, A. M.; ANDRADE, A. S. R. *Paracoccidioides brasiliensis*: attenuation of cells by gamma irradiation. **Mycoses**, v. 49, p. 184-189, 2006.
- 56 DEMICHELI, M. C., GÓES, A. M.; ANDRADE, A. S. R. Ultrastructural changes in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells attenuated by gamma irradiation. **Mycoses**, v. 50, p. 397-402, 2007.
- 57 DINIZ, S. N. *et al.* Expression in bacteria of the gene encoding the gP43 antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: Immunological reactivity of the recombinant fusion proteins. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, p. 200-204, 2002.
- 58 DINIZ, S. N. *et al.* Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v. 22, p. 485-492, 2004.
- 59 DUQUESNE, V. *et al.* Identification of T cell epitopes within a 23-kDa antigen (P24) of *Toxoplasma gondii*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 84, p. 527-534, 1991.
- 60 EDWARDS, M. R. Electron microscopic study of conidia produced by themycelium of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 114, p. 169-77, 1991.
- 61 ESSER, C.; RADBRUCH, A. Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. **Annu Rev Immunol**, v. 8, p. 717-735, 1990.
- 62 FARIAS, M. R. *et al.* Canine paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. **Ver. do Inst. de Med. Trop.** de S. Paulo, v. 47, p. 64-64, 2005.
- 63 FAVA NETTO, C. *et al.* Antígeno polissacarídeo do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultivo do *Paracoccidioides brasiliensis*, necessário ao preparo do antígeno. **Rev. Inst Med Trop.**, v. 11, p.177-181, 1969.
- 64 FAVA NETTO, C., GUERRA, M. A. G.; COSTA, E. O. Contribuição ao estudo imunológico da paracoccidioidomicose. Reações intradérmicas com dois antígenos homólogos e dois heterólogos. **Rev. Inst. Med. Trop.** S. Paulo, v. 18, p. 186-190, 1976.
- 65 FERNANDES, V. C. *et al.* The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 1062-1072, 2011.

- 66 FERNANDES, V. C. Additive effect of rPb27 Immunization and Chemotherapy in Experimental Paracoccidioidomycosis. **PLoS ONE**, v. 6, e178852011, 2011.
- 67 FERNANDES, V. C. *et al.* Protective Effect of rPb40 as an Adjuvant for Chemotherapy in Experimental Paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 2, p. 93-105, 2012
- 68 FERREIRA, M. A. Cytokine expression in allergic inflammation: systematic review of in vivo challenge studies. **Mediators Inflamm.**, v. 12, p. 259-267, 2003.
- 69 FINKELMAN, F. D. *et al.* Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. **Annu Rev Immunol**, v. 8, p. 303-333, 1990.
- 70 FIGUEIREDO, F., ALVES, L. M., C.; SILVA, C. L., Tumor necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the wall fractions thereof. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 93, p. 189-194, 1993.
- 71 FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, p. 5-18, 1986.
- 72 Franco, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, p. 5-18, 1987.
- 73 FRANCO, M., MENDES, R. P.; MOSCADI-BACCHI, M. Paracoccidioidomycosis. *Baillière's Clin. Trop. Med. Comm. Dis.*, v. 4, p.185-220, 1989.
- 74 Franco, M. *et al.* Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr Top Med Mycol**, v. 5, p. 115-49, 1993.
- 75 FRANKENBERG, D. *et al.* Evidence for DNA double-strand breaks as the critical lesions in yeast cells irradiated with sparsely or densely ionizing radiation under oxic or anoxic conditions. **Radiat. Res.**, v. 88, p. 524-532, 1981.
- 76 GEZUELE, E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. De heces de pinguino de la Antártida. In: International Meeting on Paracoccidioidomycosis,4. **Proceedings** Caracas, Venezuela, Abstract. 1989.
- 77 GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 501-517, 1999.
- 78 GIULIETTI, A. *et al.* An overview of Real-Time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.
- 79 GOLDANI, L. Z.; Sugar, A. M. Short report: use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, p. 152-3, 1998.

- 
- 80 GOLDANI, L. Z., PICARD, M.; SUGAR, A. M. Synthesis of heat-shock proteins in mycelia and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med Microbiol**, v. 40, p. 124-8, 1994.
- 81 GOMES, G. M. *et al.* PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin Microbiol**, v. 38, p. 3478-80, 2000.
- 82 GÓMEZ, B. L. *et al.* Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p.5760-5767, 2001.
- 83 GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUCK, J. D. Melanin and fungi. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 16, p. 91-96, 2003.
- 84 GONZALEZ, J. F.; MONTIEL, N. A ; MAASS, R. L. First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary Paracoccidioidomycosis in a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 12, p. 659-66, 2010.
- 85 GONZALEZ, A.W. *et al.* Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect. Immun.**, v.68, p. 2546-2552, 2000.
- 86 Gonzalez, G.M., *et al.* Efficacies of amphotericin B (AMB) lipid complex, colloidal dispersion, liposomal AMB, and conventional AMB in treatment of murine coccidioidomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2140-2143, 2004.
- 87 GREER, D. L.; RESTREPO, A. La epidemiologia de la paracoccidioidomycosis. **Bol. Of. Sanit. Panam.**, v. 83, p. 428 – 445, 1977.
- 88 Hahn, R.C. *et al.* Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**, 2003; v. 46, p. 342-7.
- 89 HERRINGTON, D. A. *et al.* Human studies with synthetic peptide sporozoite vaccine (NANP) 3 – TT and immunization with irradiated sporozoites. **Bull WHO**, v. 68, p. 33-37, 1990.
- 90 HIRAMOTO, R. M. *et al.* 200 Gy sterilized *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. **Vaccine**, v. 20, p. 2072-81, 2002.
- 91 HOFFMAN, S. L. *et al.* Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. **J. Infect. Dis.**, v. 18, p.1155-1164, 2002.

- 92 HOGAN, L. H., KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 469-488, 1996.
- 93 KASHINO, S. S. *et al.* Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 20, p. 89-97, 2000.
- 94 KERR, I. B., ARARIPE, J. R.; OLIVEIRA, P. C. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathology study of lesions in experimentally: infected rats. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 30, p. 336-350, 1988.
- 95 LACAZ, C. S. *et al.* Blastomicose experimental. **Hospital.**, v.36, p. 341-349, 1949.
- 96 LACAZ, C. S. Diagnosis and treatment of pulmonary mycoses. **Rev. Paul. Med.**, v. 38, p. 389 - 400, 1951.
- 97 LACAZ, C. S. South American blastomycosis. **An. Fac. Med.**, v. 29, p. 7-120, 1956.
- 98 LACAZ, C. S.; RAMOS, H. Anatomia patológica das micoses. **Méd. Cirurg. Farm.**, v. 246, p. 443-484, 1956.
- 99 LACAZ, C. S.; SAMPAIO, S. A. P. Tratamento de Blastomicose Sul - americana com anfotericina B: resultados preliminares. **Ver. Paulista Med.**, v. 52, p. 443-450, 1958.
- 100 LACAZ, C. S. Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidioidomicose. Um pouco de sua história. In: DEL NEGRO, G., LACAZ C. S.; FIORILLO A. M., **Paracoccidioidomycose**, São Paulo: Sarvier, 1982. p. 1-9.
- 101 LACAZ, C. S. *et al.* Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its ethiology agent. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC, 1994a. p. 1-11.
- 102 LACAZ, C. S. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC, 1994b. p. 13-22.
- 103 LACERDA, C. S. *et al.* Gamma Radiation Effects on *Sporothrix schenckii* Yeast Cells. **Mycopathologia**, v. 171, p. 395-401, 2011.
- 104 LEMKE, A., KIDERLEN. A.F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Biotechnology**, v. 68, p. 151-162, 2005.
- 105 LIEBERMAN, N.; MANDELBOIM O. The role of NK cells in innate immunity. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 479, p. 137-45, 2000.

- 106 LONDERO, A. T.; MELO, I. S. Paracoccidioidomicose (Blastomicose Sul – Americana. Doença de Lutz – Splendore – Almeida). **J. Bras. Med.**, v. 55, p. 96 – 111, 1988.
- 107 LUNDE, M. M., OTTESEN, E. A.; CHEEVER, A. W. Serological differences between acute and chronic schistosomiasis mansoni detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 28, p. 87-91, 1979.
- 108 MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. S. L. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, v. 7, p. 20-29, 2005.
- 109 MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: Epidemiological, clinical and treatment update. **An Bras Dermatol.**, v. 78, p. 135-150, 2003.
- 110 MARQUES, A. F. *et al.* Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 2814-9, 2006.
- 111 MARQUES, F. A. *et al.* Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeast of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and infection**, v. 10, p. 1251-1258, 2008.
- 112 MARTINEZ, J., Huang, X.; Yang, Y. Direct TLR2 signaling is critical for NK cell activation and function in response to vaccinia viral infection. **PLoS Pathog**, v. 6, p. e1000811, 2010.
- 113 MARTINS, E. M. N. *et al.* Mice Immunization with radioattenuated Yeast Cells of *Paracoccidioides brasiliensis*: Influence of the Number of Immunizations. **Mycopathologia**, v. 168, p. 51-58, 2009.
- 114 MARTINS, E. M. *et al.* Immunization with radioattenuated yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* induces a long lasting protection in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 25, p. 7893-9, 2007.
- 115 MATUTE, D. R. *et al.* Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**. v. 23, 65-73, 2006.
- 116 MCEWENC, J. G. *et al.* Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 165-75, 1987.
- 117 MEDZHITOV, R.; C. A. Janeway, Jr., Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Curr Opin Immunol**, v. 9, p. 4-9, 1997.
- 118 MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C., JR. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunol Rev**, v. 173, p. 89-97, 2000.

- 119 MENDES, R. P. *et al.* Treatment and control of cure. In FRANCO, M. *et al.*, **Paracoccidioidomycosis**. New York, CRS PRESS, 1994, p. 373-92.
- 120 MENDES-GIANNINI, M. J. *et al.* Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 113-123, 2000.
- 121 MOSCARDI-BACCHI, M., BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J. Med. Microbiol.**, v. 40, p. 159-163, 1994.
- 122 NAIFF, R. D. *et al.* Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 28, p. 19-27, 1986.
- 123 NAKAGAWA, *et al.* Detection of the gp43 gene and (1-3)-beta- D-glucan of *Paracoccidioides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 43, p. 29-35, 2002.
- 124 NISHIMURA, K.; Mikami, Y. Detection of the gp43 gene and (1-3)-beta-D-glucan of *Paracoccidioides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 43, p. 29-35, 2002.
- 125 ODDS, F. C., Brown, A. J.; Gow, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol**, v. 11, p. 272-9, 2003.
- 126 OKEKE, C.; COLE, G. T. Morphological defects and loss of virulence of *Coccidioides posadasii* caused by, disruption of CHS5, encoding a chitin synthase with myosin motor like domain. In: General Meeting of the American Society for Microbiology, 103. **Proceedings...** Washington, D.C., May 18-22, 2003; F23 p.227.
- 127 ORTIZ, B. L., DIEZ, S. *et al.* Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clin Diagn Lab. Immunol.**, v.5, p.826-30, 1998.
- 128 ORTIZ, B. L. *et al.* Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 5, p. 826-30, 1998.
- 129 PAPPAGIANIS, D. Evaluation of the protective efficacy of the killed *Coccidioides immitis* spherule vaccine in humans. The Valley Fever Vaccine Study Group. **American Review of Respiratory Disease**, v. 148, p. 656-660, 1993.
- 130 PARISE-FORTES, M. R. *et al.* Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis

- evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. **British Journal of Dermatology**, v. 154, p. 643-50. 2006.
- 131 PARISE-FORTES, M. R. *et al.* Immunology of Paracoccidioidomycosis. **An Bras Dermatol.** v. 86, p. 516-25. 2011.
- 132 PINA, A. *et al.* Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 2369-2378, 2004.
- 133 POPI, A. F., LOPES, J. D.; MARIANO, M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell. Immunol.**, v. 218, p. 87-94, 2002.
- 134 POWRIE, F., BEAN, A.; MOORE, K. W. Interleukin-10. In: REMICK, D. G.; FRIEDLAND, J. S. **Cytokines in health and disease**. New York : M. Dekker, c1997. p. 143-150.
- 135 PRADO, M. *et al.* Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 513-521, 2009.
- 136 PUCCIA, R. *et al.* Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis* identification of a specific antigen. **Infect. Immunology**, v. 53, p. 199-206, 1986.
- 137 PUCCIA, R. *et al.* Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. **Medical Mycology**, v.36, p. 345-348, 1998.
- 138 PUCCIA, R. *et al.* Detection of the basement membrane-degrading proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis* after SDS-PAGE using agarose overlays containing Abz-MKALTLQ-EDDnp. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 645-649, 1999.
- 139 REIS, J. A.; COLOMBO, A. L. Paracoccidioidomycose. In: FARHAT, C. K. *et al.*, **Infectologia pediátrica**. São Paulo: Atheneu, p. 524-528, 1999.
- 140 REIS, B. S. *et al.* Membrane and extracellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* (Mexo): Identification of a 28-kDa protein suitable for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 307, p. 118-126, 2005.
- 141 REIS, B.S. *et al.* Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v. 26, p. 5461-9, 2008.
- 142 RESTREPO, A. *et al.* Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 46, p. 346-353, 1984.

- 143 RESTREPO, A., MCEWEN, J. G.; SALAZAR, M. E., The mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. R. Prous Science, Barcelona**, p. 143-148, 1988.
- 144 RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). In: JACOBS, P. H.; NALL, L. **Antifungal drug therapy: a complete guide for the practitioner**. 1990, p. 181-205.
- 145 RESTREPO A. Report of activities of the committee on paracoccidioidomycosis serodiagnosis. **ISHAM Myc Newsletter**, v.59, p. 4, 1992.
- 146 RESTREPO-MORENO, A. Paracoccidioidomycosis. In: MURPHY, J. W., FRIEDMAN, H., BENDINELLI, M. **Infections agents and pathogenesis: fungal infections and immune responses**. New York: Springer, 1993, Cap. 10, p. 251-276.
- 147 RESTREPO, A., McEwen, J. G.; Castaneda, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v. 39, p. 232-241, 2001.
- 148 RIBEIRO, O. D. Nova terapêutica para blastomicose. **Publ. Méd.** v. 12, p. 36-54, 1940.
- 149 RHIND, N.; RUSSEL, P. Mitotic DNA damage and replication checkpoints in yeast. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, p. 749-758, 1998.
- 150 RICCI, G. *et al.* Canine paracoccidioidomycosis **Medical Mycology**, v.4 2, p. 379-383, 2004.
- 151 RIVIER, D. *et al.* Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. **Parasite Immunology**, v.15, p. 75-84, 1993.
- 152 ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 1-23, 2004.
- 153 SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, v. 165, p. 183-95. 2008.
- 154 SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. Variability of cell wall composition in *Paracoccidioides brasiliensis*: a study of two strains. **Sabourandia**, v. 20. p. 31-40, 1982.
- 155 SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. **A review. Mycopathologia**, v. 62, p. 77-86, 1977.

- 156 SAN-BLAS, G. Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives of Medical Research**, v. 24, p. 267-8, 1993.
- 157 SAN-BLAS, G. *et al.* A model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. **Acta Científica Venezolana**, v. 38, p. 202-211, 1987.
- 158 SHARMA, R. L.; BHAT, T. K.; DHAR, D. N. Control of Sheep lungworm in India. **Parasitology Today**, v. 4, p. 33-6, 1988.
- 159 SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 297-310, 2006.
- 160 SILVA, M. B. *et al.* Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 197-205, 2006.
- 161 SILVA-VERGARA, M. L. *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**. v. 38, p. 193-9, 2000.
- 162 SNAPPER, C. M., MARCU, K.; BZELAZOWSKI, P. The immunoglobulin class switch: beyond "accessibility". **Immunity.**, v. 6, p. 217-223, 1997.
- 163 SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, v. 236, p. 944-7, 1987.
- 164 SNAPPER, C.M. *et al.* Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell independent type 2 antigens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, p. 1367-71, 1992.
- 165 SOUTO, J. T. *et al.* Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\beta$  determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Journal of Pathology**. v. 156, p. 1811-1820, 2000.
- 166 SPETH, C. *et al.* The role of complement in invasive fungal infections. **Mycoses**, v. 47, p. 93-103, 2004.
- 167 TABORDA, C. P. *et al.* Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 786-793, 1998.
- 168 TABORDA, C. P. Synthesis and Immunological Activity of a Branched Peptide Carrying the T-cell Epitope of gp43, the Major Exocellular Antigen of

- Paracoccidioides brasiliensis*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, p. 58, 2004.
- 169 TABORDA, C. P. *et al.* Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v. 165, p. 331-9. 2008.
- 170 TAYLOR, S. M.; MALLON, T. R.; GREEN W. P. Comparison of vaccination and ivermectin treatment in the prevention of bovine lungworm. **Veterinary Record**, v.119, p.370-372, 1986.
- 171 TEIXEIRA, M.M. *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, p. 273-83, 2009.
- 172 TELLES, F. **Blastomicose sul-americana**. Boletim epidemiológico - Secretaria de Estado de Saúde Disponível em:  
[http://www.saude.pr.gov.br/.../pcm\\_sesa.htm/](http://www.saude.pr.gov.br/.../pcm_sesa.htm/) Acesso em: 23 mar. 2011.
- 173 TONELLI, E.; FREIRE, L. M. S. Doenças Infecciosas na Infância e Adolescência. IN: ANDRADE, G. M Q.; NOGUEIRA, M. G. S. **Micoses profundas II** : paracoccidioidomicose, Rio de Janeiro: Medsi, 2000, 1490-1510p.
- 174 TRACEY, K. J.; CERAMI A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. **Annu Rev Cell Biol**, v. 9, p. 317-43, 1993.
- 175 TRAVASSOS, L. R. *et al.* Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. **Mycopathologia**, v. 165, p. 341-52, 2008.
- 176 TSUNAWAKI, S., SPORN, M., DING, A.; NATHAN, C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. **Nature**, v. 334, p. 260-2, 1988.
- 177 URBAN, J. F.; TROMBA, F. G. Development of immune responsiveness to *Ascaris suum* antigens in pigs vaccinated with ultraviolet attenuated eggs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 3, p. 399-409, 1982.
- 178 VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 1997. p. 1101-1131.
- 179 VICENTINI, A. P. *et al.* Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infection and Immunity**. v. 62, p. 4-7, 1994.
- 180 VISBAL, G. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. **Current drug targets. Infectious disorders**, v. 5, p. 211-26. 2005.

- 181 VIVIER, E. *et al.* Functions of natural killer cells. **Nature Immunology**, v. 9, p. 503-10. 2008.
- 182 VOS, G. J.; GARDINER, P. R. Antigenic relatedness of stocks and clones of *Trypanosoma vivax* from east and west. **Parasitology**, v. 100, p. 101–106, 1990.
- 183 WALES, A.; KUSEL, J. R. Biochemistry of irradiated parasite vaccines; suggested models for their mode of action. **Parasitology Today**, v. 8, p. 358-363, 1992.
- 184 WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO M., LACAZ C. S., RESTREPO-MORENO A.; DEL NEGRO G. (eds). **Paracoccidioidomycosis**, Boca Raton: CRC Press, 1994, p. 109-120.
- 185 WEDRYCHOWICZ, H., MACCLEAN, J. M.; HOLMES, P. H. *Nippostrongylus brasiliensis*: local humoral responses in the lungs and intestines of rats following vaccination with irradiated larvae. **Experimental Parasitology**, v. 1, p. 25-33, 1984.
- 186 Wüthrich M, *et al.* Safety, Tolerability, and Immunogenicity of a Recombinant, Genetically Engineered, Live-Attenuated Vaccine against Canine Blastomycosis. **Clinical and vaccine immunology**, v. 18, p. 783–789, 2011.
- 187 WÜTHRICH, M. B., FILUTOWICZ, H. I.; KLEIN, B. S. Mutation of the WI-1 gene yield an attenuated *Blastomyces dermatitidis* strain that induces host resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, p. 1381-1389, 2000.
- 188 XANDER, P. *et al.* A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. **Microbes Infection**, v. 9, p. 1484-92, 2007.
- 189 YANG, D. M., ROGERS, M. V.; LIEW, F. Y. Identification and characterization of host-protective T-cell epitopes of a major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major*. **Immunology**, v. 72, p. 3–9, 1991.
- 190 YATES, J. A.; HIGASHI, G. I. Ultrastructural observations on the fate of *Brugia malayi* in jirds previously vaccinated with irradiated infective stage larvae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, p. 982-7, 1986.
- 191 YONETO, T. *et al.* Gamma interferon production is critical for protective immunity to infection with blood-stage *Plasmodium berghei* XAT but neither No production nor NK cell activation is critical. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 2349-2356, 1999

**X ANEXOS**

## CERTIFICADO DO CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

## CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 132/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação em modelos animais da capacidade protetora de leveduras radioatenuadas do *Paracoccidioides brasiliensis***", que tem como responsável **Antero Silva Ribeiro de Andrade**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **20/ 12/2006**.

Este certificado expira-se em **20/ 12 / 2011**.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 132/2006**, related to the project entitled "***Paracoccidioides brasiliensis* radioattenuated yeast: evaluation of the induction of protective immunity in animals models**", under the supervision of **Antero Silva Ribeiro de Andrade**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the ***Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)***, and was approved in **December 20, 2006**.

This certificate expires in **December 20, 2011**.

Belo Horizonte, 22 de Dezembro de 2006.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Presidente do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

{Mod.Cert. v1.0}

{Mod.Cert. v1.0}

## DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

TIPO	TÍTULO	DATA
XI International Meeting on Paracoccidioidomycosis.	Immunogenic evaluation of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> radioattenuated yeast in murine model. (Póster)	2011
International Nuclear Atlantic Conference - INAC/ENAN.	Immunogenic evaluation of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> radioattenuated yeast in murine model. (Resumo expandido).	2011
International Nuclear Atlantic Conference - INAC/ENAN.	Protective effect of the LevRad on treat of Paracoccidioidomycosis. (Apresentação Oral)	2011
VI Congresso Brasileiro de Micologia	Evaluation of the immunogenic potential of yeasts of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> attenuated by gamma irradiation in the prophylactic vaccination of mice. (Apresentação Oral)  Avaliação do potencial da vacinação terapêutica com a LevRad em PCM experimental. (Póster)	2010
International Nuclear Atlantic conference (INAC/ IX ENAN)	Immunization with <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> radioattenuated yeast cells induces TH1 immune response in BALB/C mice. (Resumo expandido).	2009
X International Congress on Paracoccidioidomycosis	Evaluation of the protection induced by the immunization with radioattenuated yeast cells of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> in animal model. (Póster)	2008
VI Congresso Brasileiro de Micologia	Effects of the number of immunizations on the protection elicited by a radioattenuated <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> vaccine. (Póster)	2008
VI congresso Latinoamericano de Micologia, Mar Del Plata. VI congresso Latino de Micologia: Libro de resúmenes. Buenos Aires: Asociación Latinoamericana de Micologia	Immunization with radioattenuated yeast cells of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> induces a long last protection in BALB/c mice. (Póster)	2008
XXXIII Congress of the Brazilian Society for immunology	Effects of the number of immunizations on the protection elicited by a radioattenuated <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> vaccine (Póster)	2008
VI CLAM – Congresso Latino Americano de micologia	Immunization with radioattenuated yeast cells of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> induces a long last protection in BALB/c mice. (Póster)	2008
International Nuclear Atlantic Conference (INAC), VIII ENAN AND XV ENFIR	Mice immunization with radioattenuated <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> yeast cells: protective immune response induction evaluation (Resumo expandido).	2007
Scholarships auspiced by the X International Congress on Paracoccidioidomycosis to the ten best abstracts to be presented in the Congress by a Latin American graduate student.	Evaluation of the protection induced by the immunization with radioattenuated yeast cells of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> in animal model	2008
Patente depositada INPI: PI0803262-9	Vacina radioatenuada para a paracoccidioidomicose	2008
Artigo publicado na revista Mycopathologia	Mice Immunization with radioattenuated Yeast Cells of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> : Influence of the Number of Immunizations.	7/04/2009.
Artigo submetido na revista	Evaluation of radioattenuated yeast cells as a	02/2012

---

<b>Immunology Letters</b>	therapeutic vaccine in experimental Paracoccidioidomycosis..	
Artigo em colaboração	<a href="https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.097">https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.097</a>	2008
Artigo em colaboração	<a href="https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.004">https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.004</a>	2011
Artigo em colaboração	<a href="https://doi.org/10.1007/s11046-011-9395-9">https://doi.org/10.1007/s11046-011-9395-9</a>	2011
Artigo em colaboração	<a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017885">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017885</a>	2011
Artigo em colaboração	<a href="https://doi.org/10.1007/s11046-012-9530-2">https://doi.org/10.1007/s11046-012-9530-2</a>	2012

---

**DEPOSITO DE PATENTE****“Vacina radioatenuada para a paracoccidioidomicose”****INPI: PI0803262-9**

Autores: ANDRADE, A. S. R. ; DEMICHELLI, Marina Cortez ; MARTINS, Estefânia Mara Do Nascimento ; REIS, Bernardo Sgarbi ; GOES, Alfredo Miranda

**RESUMO**

A paracoccidioidomicose é uma infecção fúngica granulomatosa e sistêmica, prevalente na América Latina, causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. Neste invento uma vacina atenuada por radiação gama foi, pela primeira vez, desenvolvida contra uma infecção fúngica. Determinamos uma dose absorvida onde as leveduras do *P. brasiliensis* perdem a capacidade de multiplicação e a virulência, porém conservam a viabilidade, a atividade metabólica, a morfologia e o perfil antigênico. As leveduras radioatenuadas (levRad) induzem um alto nível de proteção quando utilizadas para imunização do hospedeiro. Esta invenção descreve as doses de radiação, as condições de irradiação e de preparação para obtenção da vacina radioatenuada, e a eficácia protetora da mesma.