

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM
PULMÕES DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM
Pb27r SUBMETIDOS À INFECÇÃO DESAFIO POR
*Paracoccidioides brasiliensis***

ELIS ARAUJO MORAIS

**ESTUDO DA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA EM PULMÕES DE
CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM
Pb27r SUBMETIDOS À INFECÇÃO
DESAFIO POR *Paracoccidioides
brasilensis***

Dissertação apresentada ao colegiado do curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Imunologia e Bioquímica.

**Belo Horizonte
2012**

ELIS ARAUJO MORAIS

**ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM
PULMÕES DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM
Pb27r SUBMETIDOS À INFECÇÃO DESAFIO POR
*Paracoccidioides brasiliensis***

ORIENTADOR: DR. ALFREDO MIRANDA DE GÓES

COORIENTADOR: DR. DAWIDSON ASSIS GOMES

**BELO HORIZONTE
MARÇO – 2012**

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes e Coorientação do Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes. E contou com a colaboração do laboratório de Biologia do Desenvolvimento sob a coordenação da Prof^a. Gerluza Aparecida Borges Silva.

Apoio Financeiro:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – **CNPq**
Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – **FAPEMIG**

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um 'não'. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vão construir um castelo...

(Fernando Pessoa)

Dedico a toda minha família, em especial à minha querida Mãe, por ser mãe e amiga nos momentos mais difíceis, ao meu Pai e aos meus irmãos por serem meu ombro amigo e fonte inesgotável de apoio. À minha querida avó, Lourdes, por existir e ser de grande importância na minha vida. Aos amigos, e imensamente ao meu marido, Antônio Júnior, pelo amor, paciência, força e cumplicidade, companheirismo, afeto e amizade.

AGRADECIMENTOS

É difícil colocar nomes para agradecer em um papel, sou grata a todos e talvez eu possa esquecer algum nome... então se você está lendo este agradecimento e se por acaso seu nome não aparecer na lista, não fique chateado, talvez eu tenha esquecido de colocar o seu nome, mas jamais esquecerei o quanto sou grata, afinal de contas, ninguém vive sozinho, mesmo as estrelas do céu brilham juntas, mesmo as águas do oceano correm em conjunto, mesmo as lágrimas rolam duas a duas não raro acompanhadas de sorrisos...

Primeiramente agradeço à Deus, por escrever certo em linhas tortas, por me colocar no caminho o qual tive a oportunidade de viver tudo isso, pela proteção, pela vida!

Ao Professor Alfredo, por ter uma alma tão generosa, por me dar a oportunidade, pela paciência, sabedoria, disponibilidade, confiança e amizade...Chefe é chefe e finalmente a macaca está evoluindo! É enorme a gratidão ...Obrigada!

Aos meus pais Antônio Carlos (papai tá ai??) e Edna (dona branca) e aos meus irmãos Dani e Gu, que são o motivo real desta caminhada, sem vocês nada disso importa, vocês são meus exemplos, meu porto seguro ... são minha vida! Brigo com vocês mas amo demais, obrigada!

À minha amada avó, que com sua simplicidade nos ensina em todos os momentos que família é tudo, e é minha fonte de luz e inspiração!

Ao meu grande amor, Juninho.... meu marido, meu amante, meu amigo, minha vida...obrigada por aguentar minha loucura, meu nervosismo, meus ataques e minhas crises de choro... Só você sabe o quanto tudo tem sido difícil e quanto esforço eu tenho feito... obrigada por me escutar, por me acolher e por estar ao meu lado nos momentos difíceis... sem você essa dissertação não seria escrita... agradeço muito por você fazer parte da minha vida...NEOQAV.

À minha família... Tios, tias, primos e primas, por serem a base de tudo, todos vocês são importantes nesta caminhada, principalmente aos primos Fael e Thiago meus companheiros de infância e às Tias Dê, Lê, Miriam e minha madrinha Rita. À Jessica, João Vitor e ao Josué... pelo amor sincero e inocente de criança.

Aos meus sogros... Nelcy e Toninho, que me ajudam sempre e me fazem sentir como se fosse uma filha. Às minhas cunhadas, Jack e Samantha, que além de cunhadas são amigas, confidentes e parceiras do dia a dia! Ao meu cunhado Rogério, por fazer parte da família, pela alegria... pelos peixes (srsrs), você é como um irmão pra mim. À Eva e ao Arlindo, por serem pessoas tão generosas e de coração aberto sempre nos recebem em sua casa. "Ao Arlindo por se meu freguês no buraco".

Aos amigos e amigas, principalmente Djenane e Fernanda Carvalho, por continuarem sendo minhas amigas mesmo depois da faculdade, tenho certeza que Deus não colocou vocês na minha vida por acaso, vocês não precisam fazer nada para que eu goste de vocês... sempre serão minhas amigonas do peito! Alessandra (fumo), Érica Lorrane, Et, Bruninho, que são pessoas que estão sempre por perto... haja o que houver!

À Junia, que é uma pessoa que gosto muito desde a faculdade, além disso, me deu várias oportunidades de apresentação de palestras e mini-cursos no Uni-Bh que serviram para meu crescimento e amadurecimento profissional.

Aos amigos e amigas do LICM 1 e 2 que são minha segunda família Carol Andrade, Carol Melo, Carolzinha, Ana Carolina, Jú Lott, Rogéria, Natália, Patrícia, Arthur, Ana Cláudia, Alessandra Zonari, Michele, Silviene, Maira, Cíça, Verônica, Naíra, Thaís, Alexandra, Juliana Barbosa, Pablo, pelo convívio agradável e pela amizade que certamente me acompanhará por toda vida.

À Estefânia, minha “companheirassa”, este trabalho não aconteceria sem você Teté. Adoro ter você como amiga e sentirei muitas saudades no período em que você estiver fora, passamos sufoco juntas... mas foi muito bom... obrigada por tudo.

-À Vivi, pela doçura, amizade, calma e paciência, você me ajudou demais nesta caminhada...Obrigada!!!!

-À Cintia, por ser minha eterna acalmadora e minha amiga do coração, você tem uma luz enorme e uma alegria contagiante, você é uma pessoa Maravilhosa que está sempre ao lado das pessoas quando elas precisam. Quero sempre poder conviver com você. Obrigado pelos abraços nos momentos em que eu precisei!

- À Marinha minha cumadre querida que faz muita falta no lab, à Luiza a louca mais legal que eu conheço, à Betinha nossa mãe do laboratório meu eterno agradecimento e à Peu pela ajuda com os animais.

-Às minhas “parentas” científicas: Caryne... minha mãe, Cris...minha avó e Dri... minha dinda (amiga e eterna professora), vocês são uma grande família!

-Ao Pedro... “menino lindo” por aguentar as chateações...nossa Pedro como você me agüenta??

-Às meninas do LICM 2, Jerusa, Ana Carol (A rainha do Western) e Natássia, companheiras de experimento, almoço e brincadeiras!

-Ao professor Dawidson, pelo auxílio e paciência.

-Às PBzetis ... Lílian, Anne, Eliza e Laura...por se comprometerem com o PB e nos ajudarem nesta caminhada.

-À Profª Rogéria e à Profª Gerluza e À todos os membros de seu laboratório pela imensa ajuda e pela colaboração, principalmente à Jankerle, Íria e Chico...que colaboraram ativamente neste trabalho.

Ao Juliano pela paciência e ajuda com Real Time e ao Jamil por ajudar demais nas horas difíceis.

À minha linda e doce Gatinha Pandora, minha companheira de escrita e minha amiguinha, amo demais!

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com a realização desse trabalho.

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT	XVIII
I. INTRODUÇÃO.....	- 1 -
1.1 ASPECTOS GERAIS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE.....	- 1 -
1.2 FORMAS CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	- 5 -
1.3- RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	- 9 -
1.31- IMUNIDADE INATA	- 9 -
1.311- TLRs	- 13 -
1.32- IMUNIDADE ADAPTATIVA	- 15 -
1.4- RESPOSTA INFLAMATÓRIA	- 17 -
- VASCULARIZAÇÃO	- 20 -
1.5- MORTE CELULAR	- 22 -
1.6- Pb27	- 25 -
II. JUSTIFICATIVA	- 28 -
III. OBJETIVOS	- 30 -
3.1.OBJETIVO GERAL:	- 30 -
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	- 30 -
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	- 31 -
4.1. A PROTEÍNA Pb27.....	- 31 -
4.1.2. - MICRORGANISMO- <i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS</i>	- 31 -
4.2 - PCM EXPERIMENTAL	- 31 -
4.2.1 - IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS	- 31 -
4.2.2 - INFECÇÃO INTRATRAQUEAL.....	- 32 -
4.2.3 - TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS.....	- 32 -
4.2.4 - PONTOS DE EUNTANÁSIA:.....	- 33 -
4.2.5 - GRUPOS EXPERIMENTAIS	- 33 -
4.2.6 - SOROS DE CAMUNDONGOS.....	- 33 -
4.3 - ELISA	- 35 -
4.4 - OBTENÇÃO DE ÓRGÃOS.....	- 35 -

4.5 - ENSAIO DE PROTEÇÃO.....	- 36 -
4.6 - HISTOLOGIA	- 36 -
4.6.1-FIXAÇÃO	- 36 -
4.6.2 INCLUSÃO	- 36 -
4.6.3 COLORAÇÃO.....	- 37 -
4.6.4 - IMUNOHISTOQUÍMICA	- 37 -
4.7 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	- 38 -
4.7.1 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD	- 39 -
4.7.2 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA – SDS/PAGE.....	- 39 -
4.7.3 - COLORAÇÃO DO GEL:.....	- 40 -
4.7.4 - ELETROTRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS – “WESTERN BLOT”	- 40 -
4.8 - PCR EM TEMPO REAL	- 41 -
4.9 - TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	- 42 -
V. RESULTADOS.....	- 44 -
5.1-DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS	- 44 -
5.2. DETERMINAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFCs)	- 48 -
5.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	- 50 -
5.4. IMUNOHISTOQUÍMICA	- 58 -
5.5. WESTERN BLOT	- 66 -
5.6- PCR EM TEMPO REAL	- 71 -
VI. DISCUSSÃO.....	- 80 -
VII. CONCLUSÃO	- 102 -
VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	- 103 -
IX. ANEXO I-Aprovação do CETEA.....	-104.-
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	-105.-

LISTA DE ABREVIATURAS

1º PTM – 1º Ponto de Eutanásia (30 dias após a infecção desafio)

2º PTM – 2º Ponto de Eutanásia (90 dias após a infecção desafio)

ADJ - adjuvante. Grupo da PCM experimental.

Al (OH)- Hidróxido de alumínio- adjuvante utilizado na imunização.

APC - Célula apresentadora de antígeno

Apud- palavra latina usada para citações indiretas

BHI – Meio infuso cérebro coração

BSA – Albumina sérica bovina

C. parvum- *Corynebacterium parvum*

CASPASES- enzima apoptótica (do inglês “cysteine-dependent aspartate-specific proteases”)

CD – agrupamento de diferenciação (do inglês “cluster of differentiation”)

cDNA – DNA complementar

CETEA – Comitê de ética em experimentação animal

CN – controle negativo. Grupo da PCM experimental.

CP- controle positivo. Grupo da PCM experimental.

D.O – Densidade ótica

DAB – 3, 3’diaminobenzidine

DC - Células Dendríticas

DNA – Ácido Desoxirribonucléico (do inglês “Deoxyribonucleic acid”)

DNase – enzima Desoxirribonuclease

DTH – Reação de hipersensibilidade tardia (do inglês: delayed-type hypersensitivity)

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid)

ELISA - Ensaio de absorção imunoenzimático (do inglês: “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)

eNOS – enzima óxido nítrico sintase endotelial

F0 - Fração 0 de PbAg

F1 – Fração 1 de PbAg

FIII - Fração 3 de PbAg

FADD- Fas Adaptor Death Domain

Gp43 – Glicoproteína de 43 kDa de *P. brasiliensis*

HE – Hematoxilina eosina

IFN- γ Citocina interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

iNOS – enzima óxido nítrico sintase induzível

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactosidase

L – Forma leveduriforme de *P. brasiliensis*

LB – Meio Luria Bertani

M – Forma micelial de *P. brasiliensis*

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês Major histocompatibility complex)

mRNA – RNA mensageiro

MyD88 - Proteína adaptadora citosólica. Gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (do inglês “differentiation primary-response protein 88”)

NCBI – (do inglês “National Center for Biotechnology Information”)

NK- Célula matadora natural (do inglês: natural killer cel.)

NO – Óxido nítrico

P. brasiliensis- *Paracoccidioides brasiliensis*

PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos)

Pb – *Paracoccidioides brasiliensis*

Pb18 – Cepa de *P. brasiliensis* isolado virulento humano

PB27- imunizado. Grupo da PCM experimental.

PB27+ TRAT – imunizado e tratado. Grupo da PCM experimental.

Pb27r- Proteína de 27 Kda recombinante.

Pb40r – Proteína recombinante de 40 kDa de *P. brasiliensis*

PbAg - antígeno total de *P. brasiliensis*

PBS – Tampão salina fosfato (do inglês: “Phosphate buffer solution”)

PCD- Morte celular programada (do inglês programmed death cell)

PCM – Paracoccidioidomicose

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês: Polymerase chain reaction)

PMN - Células polimorfonucleares

PMSF – Inibidor de protease (do inglês Phenylmethanesulfonylfluoride)

PRR - receptores de Reconhecimento Padrão

PVDF- Fluoreto de Polivilínideno

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês “Ribonucleic acid”)

RNAse – Ribonuclease

SDS – Sódio dodecil sulfato (do inglês: sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

T CD4- linfócitos T restritos ao MHC de classe II, que expressam CD4.

T CD8 - linfócitos T restritos ao MHC de classe I, que expressam CD8.

Taq DNA polimerase – DNA polimerase termoestável (do inglês *Thermus aquaticus*)

TBS- Solução salina tamponada com Tris (do inglês “Tris-Buffered Saline”)

TBS-T – Solução salina tamponada com Tris e Tween 20. (do inglês “Tris-Buffered Saline and Tween 20”)

TEMED – N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamino

TGF- β - Fator de transformação do crescimento Beta.

TH – Células T- auxiliares (do inglês: *T helper*)

Th1 – Células T auxiliares do tipo 1 (do inglês: *T helper cells type 1*)

Th2 - Células T auxiliares do tipo 2 (do inglês: *T helper cells type 2*)

TLR – receptores tipo Toll (do inglês Toll like receptors),

TMB – (do inglês 3,3', 5, 5'- tetramethylbenzidine)

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

TRAT- tratado. Grupo da PCM experimental.

TRIF - Domínio adaptador contendo TIR indutor de IFN- β (do inglês TRIF, “TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β .”)

UFC – Unidade formadora de colônia

VEGF- receptor do fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR2-receptor do fator de crescimento endotelial vascular

YPD – Meio composto de extrato de levedura (do inglês: yeast extract), utilizado para o cultivo de células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Detecção dos níveis de anticorpos IgG anti Pb27r, em camundongos durante o período de imunização..... **Pág. 44**
- FIGURA 2.** Detecção dos níveis dos subtipos de IgG anti Pb27r, em camundongos durante os períodos de imunização..... **Pág. 45**
- FIGURA 3.** Detecção dos níveis de anticorpos IgG Total anti Pb27r após a infecção desafio por *P. brasiliensis*..... **Pág. 46**
- FIGURA 4.** Detecção dos níveis dos subtipos de IgG anti Pb27r, em camundongos após infecção desafio..... **Pág. 47**
- FIGURA 5.** Ensaio de proteção em PCM experimental **Pág. 49**
- FIGURA 6.** Análise histológica e morfométrica dos pulmões de camundongos submetidos à infecção por *P. brasiliensis* e removidos 30 dias após a infecção desafio..... **Pág. 52**
- FIGURA 7.** Análise histológica e morfométrica dos pulmões de camundongos submetidos à infecção por *P. brasiliensis* e removidos 90 dias após a infecção desafio..... **Pág. 53**
- FIGURA 8.** Microscopia de pulmão camundongo corado por Grocott, 30 dias após infecção desafio com *P. brasiliensis*..... **Pág. 54**
- FIGURA 9.** Microscopia de pulmão de camundongo corado por Grocott, 90 dias após infecção desafio com *P. brasiliensis*..... **Pág. 54**
- FIGURA 10.** Microscopia de pulmão de camundongo, colorados por Tricrômico de Masson 30 dias após infecção desafio com *P. brasiliensis*..... **Pág. 57**
- FIGURA 11.** Microscopia de pulmão de camundongo, corados por Tricrômico de Masson 90 dias após infecção desafio com *P. brasiliensis*..... **Pág. 57**
- FIGURA 12.** Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 30 dias após infecção desafio por *P. brasiliensis* demonstrando a imunolocalização do VEGF..... **Pág. 59**
- FIGURA 13.** Microscopia de pulmão de camundongo marcado pela técnica de Imunohistoquímica, 90 dias após infecção desafio por *P. brasiliensis* demonstrando a imunolocalização do VEGF..... **Pág. 60**
- FIGURA 14.** Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 30 dias após infecção desafio por *P. brasiliensis* demonstrando a imunolocalização da enzima caspase 3..... **Pág. 60**

- FIGURA 15.** Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 90 dias após infecção desafio por *P. brasiliensis*. demonstrando a imunolocalização da enzima caspase 3..... **Pág. 61**
- FIGURA 16.** Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 30 dias após infecção desafio por *P. brasiliensis* demonstrando a imunolocalização do receptor de quimiocina CCR7..... **Pág. 61**
- FIGURA 17.** Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 90 dias após infecção desafio demonstrando a imunolocalização do receptor de quimiocina CCR7..... **Pág. 62**
- FIGURA 18.** Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 30 dias após infecção desafio demonstrando a imunolocalização do receptor TLR4..... **Pág. 63**
- FIGURA 19.** Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 90 dias após infecção desafio demonstrando a imunolocalização do receptor TLR4..... **Pág. 64**
- FIGURA 20.** Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 30 dias após infecção desafio demonstrando a imunolocalização do VEGFR2..... **Pág. 64**
- FIGURA 21.** Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 90 dias após infecção desafio demonstrando a imunolocalização do VEGFR2..... **Pág. 65**
- FIGURA 22.** Western Blot de extrato pulmonar 30 e 90 dias após a infecção por *P. brasiliensis*..... **Pág. 67**
- FIGURA 23.** Western Blot de extrato pulmonar 30 e 90 dias após a infecção por *P. brasiliensis* demonstrando a expressão de VEGF..... **Pág. 67**
- FIGURA 24.** Western Blot de extrato pulmonar 30 e 90 dias após a infecção por *P. brasiliensis* demonstrando a expressão de CCR7..... **Pág. 69**
- FIGURA 25.** Western Blot de extrato pulmonar 30 e 90 dias após a infecção por *P. brasiliensis* demonstrando a expressão de TLR2..... **Pág. 69**
- FIGURA 26.** Western Blot de extrato pulmonar 30 e 90 dias após a infecção por *P. brasiliensis* demonstrando a expressão de TLR4 **Pág. 70**
- FIGURA 27.** Western Blot de extrato pulmonar 30 e 90 dias após a infecção por *P. brasiliensis* demonstrando a expressão de COLÁGENO do tipo I..... **Pág. 70**

- FIGURA 28:** Expressão relativa de IFN- γ nos pulmões de camundongos cometidos pela infecção por *P. brasiliensis*..... **Pág. 73**
- FIGURA 29:** Expressão relativa de TNF- α nos pulmões de camundongos cometidos pela infecção por *P. brasiliensis*..... **Pág. 73**
- FIGURA 30.** Expressão relativa de TGF- β nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*..... **Pág. 74**
- FIGURA 31.** Expressão relativa de IL-6 nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*..... **Pág. 74**
- FIGURA 32.** Expressão relativa de IL-10 nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*..... **Pág. 75**
- FIGURA 33.** Expressão relativa de IL-4 nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*..... **Pág. 75**
- FIGURA 34.** Expressão relativa da enzima iNOS nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*..... **Pág. 77**
- FIGURA 35.** Expressão relativa de eNOS nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*..... **Pág. 77**
- FIGURA 36.** Expressão relativa do receptor, VEGFR2, nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*..... **Pág. 78**
- FIGURA 37.** Expressão relativa de VEGF nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*. **Pág. 78**
- FIGURA 38.** Expressão relativa de TLR-4 nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*..... **Pág. 79**

LISTA DE TABELAS

TABELA I. Grupos experimentais utilizados na PCM experimental e as intervenções por eles sofridas..... **Pág. 34**

TABELA II. Anticorpos utilizados nos experimentos de IHQ e WB.. **Pág. 41**

TABELA III. Sequências dos iniciadores utilizados no RT-PCR..... **Pág. 43**

TABELA IV. Expressão de citocinas durante a infecção desafio..... **Pág. 79**

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo termo dimórfico, agente etiológico de uma micose sistêmica denominada paracoccidioidomicose (PCM). Descrita em 1908 por Adolf Lutz, esta micose é uma doença endêmica rural e suburbana, prevalente nas áreas tropical e subtropical da América Latina, com 80% dos casos descritos no Brasil. A infecção pode ser adquirida por via respiratória, através da inalação de partículas infectantes ou esporos, produzidos pela forma micelial do fungo e transportados pelo ar. A infecção primária geralmente ocorre nos pulmões e pode levar à insuficiência pulmonar crônica, resultante do desenvolvimento de fibrose, que ocorre simultaneamente com o processo inflamatório, infiltração de leucócitos e processos crônicos granulomatosos. Entre os antígenos de *P. brasiliensis*, é de notável destaque a proteína Pb27, que é um antígeno amplamente estudado e que tem demonstrado grande potencial como indutor de resposta imune protetora, bem como, marcador para imunodiagnóstico da PCM. Neste trabalho, esse antígeno foi utilizado com o objetivo de determinar a resposta inflamatória pulmonar induzida pela imunização com a proteína Pb27r e pelo tratamento com o quimioterápico Fluconazol. Para tanto, animais foram imunizados com a proteína Pb27r e, posteriormente, infectados com células leveduriformes da cepa virulenta de *P. brasiliensis* PB18 e receberam tratamento quimioterápico após a infecção desafio. As unidades formadoras de colônia foram determinadas após 30 e 90 dias de infecção e em ambas a imunização mostrou efeito protetor. Além disso, foram determinados níveis de anticorpos produzidos pelos animais antes e durante a infecção, através de ensaios de ELISA. Colorações histológicas, como Hematoxilina/eosina e Tricrômico de Masson, foram utilizadas na classificação de infiltrados inflamatórios e na detecção de fibrose pulmonar. As técnicas de Imunohistoquímica e Western Blot, foram utilizadas de forma qualitativa e quantitativa, respectivamente, para a marcação das moléculas TLR2 e TLR4, CCR7, Caspase 3 ativa, VEGF e VEGFR-2 e na detecção de fibras de colágeno tipo I. Foram detectados, também, a partir da técnica de PCR em Tempo Real, os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias e das enzimas eNOS e iNOS. A análise conjunta dos resultados obtidos mostrou que Pb27r agiu modulando positivamente os mecanismos de resposta inflamatória

e, como consequência, induziu proteção aos animais imunizados. A imunização foi capaz de induzir maior proteção e restabelecer a homeostase pulmonar após a infecção desafiadora, além de influenciar ativamente a vascularização pulmonar, a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais e impedir a exacerbação da resposta inflamatória e de fibrose pulmonar.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is a thermal dimorphic fungus and known to be the etiologic agent of a systemic mycosis called paracoccidioidomycosis (PCM). Described in 1908 by Adolf Lutz, this mycosis is rural and sub urban endemic disease, prevalent in tropical and subtropical areas of Latin America, with 80% of cases reported in Brazil. The infection may be acquired by the respiratory route through inhalation of infecting particles or spores, produced by the fungus mycelial form and transported by air. Primary infection usually occurs in the lungs and may also lead to chronic pulmonary insufficiency, resulting from the fibrosis development, which occurs simultaneously with the inflammation and leukocyte infiltration. Among antigens of *P. brasiliensis*, is especially remarkable Pb27 protein, an antigen which is extensively studied and has shown significant potential to induce a protective immune response and as marker for immunodiagnosis of PCM. In this work, this antigen was used to determine the pulmonary inflammatory response induced by immunization with the protein Pb27r. To this end, animals were immunized with the protein Pb27r and subsequently infected with 3×10^5 yeast cells of the virulent strain of *P. brasiliensis* (PB18) and received chemotherapeutic treatment 30 days after challenge infection. The UFCs were determined were determined 30 and 90 days after infection and in both the immunization had a protective effect. In addition, antibody levels produced by the animals before and during infection were determined by ELISA assays. Histological staining (He and Masson's trichrome), were used in the classification of inflammatory infiltrates and the detection of pulmonary fibrosis. The techniques of Immunohistochemistry and Western blot were used in a qualitative and quantitative form (respectively) for the marking of TLR2 and 4 receptors, chemokine receptor CCR7, active Caspase 3, VEGF and its receptor VEGFR-2 and for the detection of collagen fibers Type I. Levels of pro and anti-inflammatory cytokines and eNOS and iNOS enzymes were also detected using the technique of RT-PCR. The joint analysis of the results showed that the recombinant protein Pb27 acts positively modulating the mechanisms of inflammatory response and consequently induces protection of immunized individuals. The immunization has the ability to induce greater protection and restore pulmonary homeostasis after challenge

infection and also actively restore the pulmonary vasculature, nitric oxide production by endothelial cells and prevent the exacerbation of inflammation and lung fibrosis.

I. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidioidomicose (PCM), também conhecida como blastomicose brasileira, blastomicose sul-americana e doença de Lutz-Splendore-Almeida, foi descrita inicialmente em 1908, por Adolfo Lutz (1855-1940). Quatro anos depois, Splendore descreveu novos casos e estudou a morfologia do fungo, denominando-o *Zymonema brasiliensis*. Posteriormente, em 1930, Floriano Paulo de Almeida, instituiu a denominação *Paracoccidioides brasiliensis*. O termo paracoccidioidomicose foi instituído em 1971 na reunião de micologistas das Américas em Medellin e persiste, até hoje, como nomenclatura oficial (Lacaz, 2002; Oliveira, 2012).

A PCM é causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, que taxonomicamente encontra-se no Reino: *Fungi*, Filo: *Eumycota*, Classe: *Hyphomycetes*, Ordem: *Moniliales*, Família: *Moliniaceae*, Gênero *Paracoccidioides* e Espécie *brasiliensis* (Lacaz, 2002; Oliveira, 2012).

O fungo *P. brasiliensis* conhecido apenas em sua forma assexuada, apresenta dimorfismo termo dependente e pode apresentar aspectos morfológicos distintos, dependendo do meio de cultivo e, principalmente, da temperatura de incubação (Lacaz, 2002; Oliveira, 2012).

Crescendo na natureza (temperatura 25°C), é observado com estruturas filamentosas contendo propágulos infectantes chamados conídios, sob a forma de colônias brancas, aderentes ao meio. Microscopicamente, observam-se hifas delgadas, hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas com produção de clamidósporos terminais ou intercalares os conídios, ausência de corpo de frutificação. Esta forma é denominada de saprofítica ou micelial (Brummer *et. al.*, 1993; Lacaz, 2002).

Uma vez inalados ou quando cultivados a 35°C-37°C (temperatura corporal), em meios enriquecidos, desenvolve colônias de coloração creme, chamadas cerebriformes ou leveduriformes. Ao microscópico verifica-se a presença de células arredondadas ou ovais, medindo de 5 a 25 µm de diâmetro,

multinucleadas, com paredes celulares espessas, birrefringentes, rodeadas por multibrotamentos, esta forma é denominada de variante L ou levedura. Esta fase é conhecida também como parasitária, pois é encontrada causando lesões nos tecidos do hospedeiro humano ou animal. O fenômeno de mudança de forma conforme a temperatura descrito acima é denominado dimorfismo, e é reversível (Brummer *et. al.*, 1993; Lacaz, 2002).

Até o momento, não foi totalmente esclarecido o hábitat natural e as condições de vida saprofítica de *P. brasiliensis*. Em função das características ecológicas das regiões endêmicas acredita-se que o patógeno habite preferencialmente ambiente úmido, com temperaturas médias anuais entre 18°C a 24°C e índices pluviométricos elevados. Estudos demonstraram que *P. brasiliensis* é capaz de se desenvolver tanto em solos argilosos quanto em arenosos, desde que a taxa de umidade seja elevada (Tercarioli *et. al.*, 2007; Bagagli *et. al.*, 2008). Até recentemente, os humanos eram tidos como os únicos hospedeiros naturalmente infectados por este fungo. Atualmente, o fungo *P. brasiliensis* já foi isolado do trato intestinal de morcegos – *Artibeus lituratus*, do fígado e cólon de sagüi – *Saimiri sciureus*, das fezes de pingüim – *Pygoscelis adeliae* e do fígado, baço, pulmões e linfonodos mesentéricos de tatus-galinha - *Dasypus novemcinctus*. Os tatus-galinha não são apenas reservatórios de *P. brasiliensis*; são também acometidos por PCM, com desenvolvimento de granulomas ricos em células leveduriformes comprovados por exame anatomopatológico dos órgãos acima mencionados (Bagagli *et. al.*, 1998; Brummer *et. al.*, 1993; Lacaz, 2002; Oliveira, 2012)

A micose apresenta distribuição geográfica restrita a países da América Latina, apresentando maior incidência no Brasil, Venezuela e Colômbia. O Brasil concentra cerca de 80% dos casos. Há regiões com alta prevalência da doença situadas ao lado de outras com prevalência muito baixa. A estimativa da sua incidência em áreas endêmicas da América Latina é de um a três casos por 100.000 habitantes (Brummer *et. al.*, 1993). Ainda, estima-se que a taxa anual de incidência entre a população brasileira seja de 1-3 por 100.000 habitantes e a de mortalidade, de 0,14 por 100.000 habitantes (Wanke e Aide, 2009)

Calcula-se que nas regiões endêmicas existam, aproximadamente, 10 milhões de pessoas infectadas por *P. brasiliensis*, no entanto, a maioria não apresenta sintomas clínicos. No Brasil são encontrados em quase todas as regiões do território nacional: Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Norte, sendo que casos esporádicos da doença têm sido relatados no Nordeste (Moreira, 2008).

Entre 1980 a 1995, foram registrados 3181 óbitos por PCM no Brasil, o que representa média anual de 198,81 mortes e uma taxa de mortalidade de 1,45/milhão de habitantes. E esta taxa foi de 1,0/milhão de habitantes de 1996 a 2006. Esta micose foi responsável pela maior parte do número total de mortes atribuídas às sete principais doenças sistêmicas fúngicas. Essa taxa de mortalidade é a maior entre as micoses sistêmicas e é a oitava entre as doenças infecto-parasitárias crônicas recorrentes, superando inclusive a leishmaniose. Isso demonstra que a doença possui grande magnitude e pequena visibilidade (Coutinho *et. al.*, 2002; Martinez, 2010).

O expressivo número anual de novos pacientes, o grande contingente de casos com seguimento prolongado e as características médico-sociais mencionados acima revelam a ampla dimensão da PCM como um problema de saúde pública no Brasil e enfatiza a sua condição de doença negligenciada (Martinez, 2010). Contudo, como a PCM não é uma doença de notificação compulsória, os cálculos de prevalência, incidência e morbidade da micose são baseados em relatos de inquéritos epidemiológicos (Shikanai-Yasuda *et. al.*, 2006). O fato de que a notificação de casos da doença não é obrigatória, é talvez a principal razão pela qual paracoccidiodomicose seja negligenciada no planejamento da saúde pública no Brasil (Martinez, 2010).

O grande fator de risco para aquisição da infecção são as profissões ou atividades relacionadas ao manejo do solo, contaminado com o fungo. A PCM - infecção é prioritariamente adquirida nas duas primeiras décadas de vida, com maior incidência entre 10 e 20 anos de idade. Porém, a evolução para doença raramente acontece neste período. Estudos de casuística mostram que 3% a 10% dos pacientes com a doença têm menos de 15 anos de idade (Brummer *et. al.*, 1993). A PCM Doença é mais comum em indivíduos entre 30 e 50 anos de idade, e acontece como reativação de foco endógeno latente e depende de

fatores relacionados tanto ao agente infeccioso quanto ao hospedeiro (Palmeiro *et. al.*, 2005). A maioria dos casos de paracoccidioidomicose ocorre em indivíduos do sexo masculino (com proporção que varia de 5,4 a 10,0 homens para cada mulher acometida) (Blotta *et. al.*, 1999; Marques, 2003). Essa diferença não ocorre na infância, onde a infecção e a doença se distribuem uniformemente entre ambos os sexos, nem em inquéritos soroepidemiológicos com paracoccidioidina, onde não há diferença entre os sexos nas taxas de PCM - infecção. O que sugere que a progressão da infecção para doença seja muito mais comum nos homens (Moura 2008).

A doença geralmente tem maior propensão em indivíduos, fumantes e etilistas crônicos, cujas condições de higiene, nutricionais e socioeconômicas são precárias, há casos desta micose associados à infecção pelo HIV, neoplasias e, mais raramente, à transplantes de órgãos. A maioria dos pacientes, quando procuram atenção médica, já saíram da área endêmica, residindo em centros urbanos onde exercem outras atividades, não ligadas ao trato do solo (Moura, 2008). A enfermidade é considerada um grave problema de saúde pública devido à existência de extensas áreas endêmicas associadas às importantes repercussões econômico-produtivas dos indivíduos afetados. Apesar de existirem áreas endêmicas bem definidas, o caráter casual e não repetitivo das observações, aliado às dificuldades de isolamento do agente etiológico, dificulta a exata localização do patógeno no ambiente. Além disso, o prolongado período de latência da doença e as frequentes migrações das populações de áreas endêmicas tornam praticamente impossível a identificação do local onde a infecção foi adquirida (Ameen *et. al.*, 2009; Palmeiro *et. al.*, 2005).

PCM não é uma doença contagiosa de pessoa para pessoa, porém, a patogênese da doença ainda não é bem definida. Acredita-se que o homem seja o hospedeiro acidental do *P. brasiliensis*. Várias portas de entrada já foram sugeridas para o fungo, incluindo pele e mucosa do trato gastrointestinal, contudo, tais teorias não foram comprovadas (Brummer *et. al.*, 1993).

Gonzáles-Ochoa (1956) consolidou a hipótese de que o mecanismo de infecção da PCM ocorria pela via área superior, por meio da inalação de formas

fúngicas diminutas denominadas conídios, geradas a partir da forma micelial. Uma vez inalados, propágulos (microconídios) atingem o trato respiratório inferior, onde um complexo primário é formado, e sob efeitos da temperatura corpórea do hospedeiro, alguns sistemas enzimáticos do patógeno são ativados, permitindo a transformação da forma infectante em parasitária. Atualmente, esta via de infecção é a mais aceita, sendo evidenciada pelo frequente achado de lesões pulmonares em exames de autopsias e pelo isolamento de *P. brasiliensis* em amostras de escarro e lavado brônquico de pacientes portadores de lesões pulmonares (Moreira, 2008).

Nos tecidos, a reatividade do hospedeiro induz reação inflamatória, que culmina na formação de granuloma. Este representa uma resposta do hospedeiro ao agente agressor, na tentativa de bloquear e restringir seu desenvolvimento, impedindo sua multiplicação e disseminação para órgãos e tecidos adjacentes. A evolução do granuloma está intimamente relacionada ao tipo de resposta imune desencadeada pelo hospedeiro, bem como aos componentes de parede liberados pelo patógeno. A PCM, assim como outras doenças fúngicas, depende da interação entre o fungo e a resposta imunológica do hospedeiro para evoluir para a cura espontânea ou disseminar-se pelo organismo. Os mecanismos relacionados à resistência ou à suscetibilidade do homem ao *P. brasiliensis* ainda são desconhecidos (Wanke e Aide, 2009; Palmeiro *et. al.*, 2005).

1.2 FORMAS CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

A PCM apresenta-se sob duas formas clínicas diferentes, a infecção e a doença. A PCM infecção é assintomática e ocorre frequentemente em indivíduos saudáveis que residem (ou residiram) em áreas endêmicas e que possuem reatividade ao teste de pele com paracoccidioidina. Também são incluídos nesta forma clínica os indivíduos com lesões residuais inativas que contém *P. brasiliensis*. A PCM doença é sintomática e, dependendo do seu curso, se divide em aguda ou crônica (Shikanai-Yasuda *et. al.*, 2006).

A forma aguda ou subaguda representa cerca de 3 a 5% dos casos e se caracteriza por pequenos períodos de incubação do fungo (semanas a meses),

é mais severa, com rápida disseminação para órgãos do sistema retículo-endotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea) apresentando múltiplas lesões. Ocorre em crianças e adultos jovens de forma semelhante em ambos os sexos, podendo eventualmente, acometer indivíduos até os 35 anos de idade. As principais manifestações da doença são linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, sintomas digestivos, cutâneos e sintomas osteoarticulares. Outras manifestações incluem febre, anemia e perda de peso. O acometimento pulmonar é raro. Pacientes em geral apresentam depressão da resposta imune celular e aumento na produção de anticorpos específicos (Wanke e Aide, 2009; Shikanai-Yasuda *et. al.*, 2006)

A forma crônica (tipo adulto), com cerca de 90% dos pacientes, progride lentamente (meses a anos) de forma silenciosa e ocorre quase exclusivamente em pacientes do sexo masculino com idade superior a 30 anos. Afeta, primeiramente, os pulmões, levando a significativa morbidade. Posteriormente, a doença pode ficar restrita ao pulmão (unifocal) ou disseminar para outros órgãos e tecidos (multifocal), formando lesões secundárias nas membranas mucosas, pele, linfonodos, glândulas adrenais e sistema nervoso central. O envolvimento das mucosas do trato respiratório pode levar a complicações como disfagia, disfonia e até obstrução da traquéia (Fernandes, 2011; Ameen *et. al.*, 2009).

Um diagnóstico rápido e preciso da PCM possibilitaria o início da terapia específica evitando maiores danos aos pulmões, além da disseminação para outros órgãos e desenvolvimento de fibrose. Atualmente, existem alguns exames laboratoriais que são úteis para confirmar a suspeita clínica de PCM. Entre eles, podem-se citar os exames micológicos, anátomopatológicos e sorológicos (Palmeiro *et. al.*, 2005).

O diagnóstico de certeza é estabelecido pelo encontro de elementos fúngicos sugestivos de *P. brasiliensis* em exames microbiológicos (exame a fresco de escarro ou outro espécime clínico raspado de lesão, aspirado de linfonodos). Porém, o fungo apresenta crescimento lento em meios de cultura, demorando em média duas a três semanas para iniciar seu desenvolvimento em ágar

Sabouraud-dextrose, à temperatura ambiente ou à 37 °C (Palmeiro *et. al.*, 2005).

A identificação do parasito em tecidos (anatomopatológico) constitui método diagnóstico de grande relevância, sendo muito utilizado na prática clínica. A biópsia é recomendada para o diagnóstico definitivo e mostra um granuloma com células gigantes e blastóporos, estruturas como cistos, com aproximadamente 30 µm de diâmetro, geralmente seguidos por esporos filhos. As colorações nitrato de prata metenamina (Groccott-Gomori) e PAS são empregadas para evidenciar o microrganismo, porém nem sempre é possível realizar este tipo de exame (Shikanai-Yasuda *et. al.*, 2006; Palmeiro *et. al.*, 2005).

Os testes sorológicos revelam a existência do microrganismo antes mesmo dos exames cultural e histopatológico, e são de amplo uso na confirmação da doença. A sorologia para a PCM, além de auxiliar no diagnóstico, é útil no controle de cura dos pacientes. Com o uso de técnicas padronizadas e antígenos adequados, a sensibilidade e a especificidade desses testes variam de 85% a 100%. Dentre os métodos diagnósticos indiretos, as reações sorológicas são as mais utilizadas na prática clínica (Camargo, 2008; Blotta *et. al.*, 1999).

O tratamento da paracoccidiodomicose consiste em duas fases: ataque e manutenção. O tratamento de ataque corresponde ao controle imediato dos sinais e sintomas da doença, como também redução da carga parasitária para a recuperação da imunidade celular do hospedeiro, passo fundamental para o êxito do tratamento. A terapêutica de manutenção é realizada por tempo prolongado (de meses a anos), até que se obtenham critérios de cura, buscando reduzir o risco de recorrência da doença. Em função disto existe uma busca contínua para novos tratamentos (Palmeiro *et. al.*, 2005; Fernandes, 2012).

Para o tratamento da PCM, têm-se disponíveis diversos medicamentos eficazes, mas com limitação decorrente de sua toxicidade, interação medicamentosa ou custo. De modo geral, *P. brasiliensis* é um fungo sensível à

maioria das drogas antifúngicas. As drogas eficazes contra a paracoccidiodomicose compreendem três grupos: Anfotericina B, do grupo de antibióticos poliênicos; sulfadiazina e outros compostos sulfanilamídicos; e o grupo de drogas azólicas com atuação sistêmica (Marques, 2003).

As Sulfonamidas, apesar da menor eficácia em comparação com os demais esquemas terapêuticos da PCM, tem custo relativamente baixo e está disponível na rede pública de saúde de quase todos os municípios do Brasil. A sulfamidoterapia, também pode ser usada como terapia de manutenção, a ser iniciada após seis meses de tratamento com outra droga, com a finalidade de reduzir as recidivas da doença, que são muito comuns. Devido à menor eficácia antifúngica dessa classe de drogas, sugere-se um tratamento mais longo, de dois a cinco anos, se for usada isoladamente. A taxa de recidivas é alta: pode atingir 35% nos pacientes acompanhados por 10 anos após a interrupção do tratamento (Brummer *et. al.*, 1993).

A Anfotericina B foi a segunda droga introduzida no tratamento da PCM e possui ampla ação antifúngica. Por ser mais eficiente do que as sulfonamidas tornou-se a principal ferramenta para o tratamento de pacientes com a doença severa disseminada. Apesar disso, apresenta elevada toxicidade sistêmica, sobretudo renal, e por ser administrada por via endovenosa, deve ser reservada para casos graves de PCM, que necessitem de pronta intervenção. As apresentações lipossomais da droga têm toxicidade bastante inferior, porém seu custo é muito elevado. A resposta terapêutica é usualmente rápida e a duração do tratamento depende do estado do paciente e gravidade da doença. Casos de recidiva são comuns, em 15 a 25% (Shikanai-Yasuda *et. al.*, 2006; Marques, 2003).

Os derivados azólicos constituem opção de grande uso no tratamento contra *P. brasiliensis*. Seu uso, na maioria dos casos, pode ser suspenso com segurança após 12 a 18 meses de tratamento. Os Azóis tem se mostrado eficientes para os propósitos clínicos, apresentando poucos efeitos colaterais e alguns casos de recidiva (Visbal *et. al.*, 2005). Entre os azóis, o Itraconazol tem sido a droga de escolha, por sua maior eficácia e tolerância. Permite o controle das formas leves e moderadas da PCM em menor tempo e com menor taxa de recidivas,

isto é, 3% a 5% dos casos. O Cetoconazol, é uma alternativa de custo menor, também eficaz; entretanto, possui hepatotoxicidade significativa e interação com inúmeras drogas. A taxa de recidiva em seguimento de três anos após sua suspensão é de 11%. O Fluconazol, é utilizado por via endovenosa como droga de escolha em casos de PCM do sistema nervoso central, por ser o azólico que possui melhor penetração na barreira hematoencefálica (Visbal *et. al.*, 2005 , Brummer *et. al.*, 1993).

O sucesso da terapia depende tanto do antifúngico utilizado, como do grau de disseminação das lesões e da capacidade imunológica do paciente. Apesar da existência de um número considerável de opções de terapia utilizadas para o tratamento da PCM, a eliminação do fungo nos tecidos é demorada, e os doentes devem ser periodicamente examinados por meio de exames clínicos e complementares, para avaliar a regressão dos sintomas e desaparecimento das lesões ativas. Por isso, a busca por drogas antifúngicas mais seletivas e estratégias terapêuticas mais eficientes para o tratamento continua (Visbal *et. al.*, 2005; Palmeiro *et. al.*, 2005).

1.3- RESPOSTA IMUNOLÓGICA

O estabelecimento da doença, sua propagação e gravidade dependerão de fatores inerentes ao fungo, como sua virulência, a composição antigênica, condições ambientais e, especialmente, os fatores relacionados à capacidade do hospedeiro para desenvolver uma resposta imune eficaz. Com relação a este último aspecto, podemos considerar que *P. brasiliensis* sintetiza antígenos metabólicos que interagem com o sistema imune do hospedeiro, causando uma resposta imunológica altamente complexa e multifatorial. Estudos clínicos e experimentais têm sugerido uma interação entre mecanismos específicos e inespecíficos de defesa na determinação resistência a *P. brasiliensis* (Fortes *et. al.*, 2011; Calich *et. al.*, 2008a).

1.31- IMUNIDADE INATA

Imunidade inata é definida como a primeira fase da resposta imune, formada por elementos do sistema imune que interagem diretamente com todos os tipos

de microrganismos, levando à destruição ou inibição de crescimento. A imunidade Inata, é mediada por barreiras físicas, elementos químicos e componentes celulares do sistema imunológico (Calich *et. al.*, 2008a).

Como a infecção por *P. brasiliensis* acontece por via pulmonar, a resposta à infecção é iniciada pela secreção de várias proteínas antimicrobianas pelo epitélio pulmonar e pela atividade fagocítica de macrófagos alveolares residentes. O reconhecimento do microrganismo pela imunidade inata é mediado pelos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR) que interagem com estruturas conservadas do patógeno, os chamados Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMP) (Bonfim *et. al.*, 2009). Vários mecanismos da imunidade inata, tais como, a ativação de proteínas do complemento, o reconhecimento dos PAMPs por receptores TLR (Toll Like receptors); atividade microbicida de células natural killer (NK) e fagócitos; produção de citocinas inflamatórias, entre outros, desempenham um papel importante na resposta do hospedeiro aos patógenos (Calich *et. al.*, 2008a).

A interação inicial macrófago-patógeno resulta na internalização do fungo pela célula ativada que pode eliminar o microrganismo através da ação de espécies reativas do oxigênio, enzimas líticas ou contenção microbiana. Além disso, a secreção de quimiocinas e citocinas controla a expressão de moléculas de adesão celular e quimiotáticas que regulam a entrada e ativação inflamatória de células para o local da infecção. Os fagócitos possuem importante papel na defesa dos hospedeiros, uma vez que *P. brasiliensis* é um microrganismo intracelular facultativo. Para uma eliminação efetiva do fungo por monócitos é necessário um sinal de ativação inicial induzido pelo IFN- γ para estimular as células a produzirem TNF- α que poderá estar envolvido, através de uma via autócrina, na fase final do processo de ativação (Brummer *et. al.*, 1993; Fortes *et. al.*, 2011). Além disso, o IFN- γ ativa os macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO), o qual inibe a transformação de *P. brasiliensis* de micélio para levedura (Gonzalez *et. al.*, 2000).

Vários tipos de células podem exercer a função de APC (célula apresentadora de antígenos), como macrófagos, células endoteliais e células B, mas as células dendríticas (DC) são consideradas as APCs "profissionais", devido à

sua habilidade especial para ativar as células T. Durante a infecção, DCs periféricas são ativadas pela interação com microorganismos ou mediadores inflamatórios. Ativada, a DC apresenta antígenos codificados por patógenos para células T não comprometidas (*naive*) antígeno específicas que iniciam as repostas primárias das células T (Calich *et. al.*, 2008a). Além das células dendríticas, as células polimorfonucleares (PMN) estão presentes em grandes quantidades nos tecidos infectados e desempenham um papel importante na atividade fungicida contra *P. brasiliensis* através de mecanismos dependentes de metabólitos de oxigênio, tais como superóxido e H₂O₂. PMN são essenciais no início da infecção, conferindo resistência ao hospedeiro e contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz contra o *P. brasiliensis* (Dias *et. al.*, 2004; Fortes *et. al.*, 2011).

O papel das células NK não tem sido bem estudado em PCM, mas investigações nesta área sugerem que elas possuem uma função complexa na infecção. No sangue periférico de pacientes com PCM, as células NK foram encontradas em número elevado, mas apresentaram baixa atividade citotóxica. Estudos *in vitro* mostraram um efeito inibidor direto de células NK no crescimento de *P. brasiliensis* (Jimenez e Murphy, 1984).

A ativação do complemento pelo *P. brasiliensis* foi confirmada por vários estudos, e ambas as vias, clássica e alternativa são ativadas em pacientes como resposta ao fungo (Calich *et. al.*, 2008a).

As quimiocinas constituem uma grande família de citocinas de baixo peso molecular, de 8 a 15 kDa, com propriedade quimiotática seletiva. As quimiocinas desempenham papel fundamental na resposta inflamatória, recrutando células inflamatórias para o local da lesão por quimiotaxia. Além de participar do recrutamento de leucócitos; as quimiocinas influenciam a em sua maturação e ativação, contribuem para a patogênese de diversas doenças, controlam e atuam em diversos processos biológicos como hematopoiese, angiogênese e metástase de tumores. Mais de 50 quimiocinas e pelo menos 15 receptores já foram descritos. As quimiocinas possuem quatro resíduos conservados de cisteínas e são classificadas de acordo com a posição de dois desses resíduos, por isso, são agrupadas em quatro subfamílias: CXC, CC,

CX3C e C, de acordo com o número de resíduos conservados de cisteína (C) na extremidade N-terminal da molécula e com o espaçamento entre eles. As várias quimiocinas e seus receptores são expressos por leucócitos, células endoteliais, epiteliais musculares, dendríticas entre outras. Os níveis das quimiocinas estão associados com a atividade de diversas doenças inflamatórias e infecciosas (Colobran *et. al.*, 2007; Bilate, 2007).

Quimiocinas e receptores de quimiocinas desempenham um papel no recrutamento de células inflamatórias durante reações granulomatosas. As quimiocinas CC atraem monócitos, eosinófilos, células dendríticas e linfócitos com seletividade variável. A atração seletiva de leucócitos em resposta à quimiocinas pode ser determinada pela expressão de receptores específicos de quimiocinas na superfície da célula (Souto *et. al.*, 2003). Souto, *et. al.*(2003), mostraram que *P. brasiliensis* induz a expressão de receptores CCR5 e CXCR3 no pulmão de camundongos infectados. Além disso, foi observado que o IFN- γ está intimamente relacionado com a modulação da expressão de quimiocinas e, conseqüentemente, do infiltrado leucocitário.

O receptor de quimiocina CCR7 foi descrito inicialmente como um potente receptor quimiotático de leucócitos, que mais tarde foi mostrado por ser responsável pela migração de células dendríticas (DCs) para os linfonodos, onde estas células desempenham um papel importante na iniciação da resposta imune. Recentemente, uma variedade de estudos indicaram que, além da quimiotaxia, CCR7 controla a citoarquitetura, a taxa de endocitose, a sobrevivência, a velocidade migratória e a maturação das DCs. Algumas destas funções de CCR7 e funções adicionais também têm sido descritas em outros tipos celulares, tais como em neutrófilos (Sánchez-Sánchez *et. al.*, 2006; Beauvillain *et. al.*, 2011).

Porém, apesar da migração de leucócitos ser essencial à resposta inflamatória e à resposta do hospedeiro frente ao processo infeccioso, este processo controlado por quimiocinas e seus receptores tem assumido um papel central na fisiopatologia de várias doenças (Oliveira *et. al.*, 2007). Vários receptores de quimiocina como o CCR5 e o CXCR4, servem como co-receptores para o vírus

HIV e determinam o tropismo viral por facilitarem a entrada nas células (Oliveira *et. al.*, 2007; Azevedo-Pereira, Santos-Costa, 2008).

No melanoma, as células tumorais CXCR4 podem também expressar os receptores CCR7 e CCR10, os quais estão envolvidos com a ocorrência de metástase nos principais sítios deste tipo de câncer: os linfonodos e a pele (Urakami *et. al.*, 2004). Em várias doenças a fibrose também está relacionada com receptores de quimiocina, entre eles o CCR1, CCR2, CCR4 e o CCR7 (Yoshida *et. al.*, 2011).

Em PCM, o receptor CXCL9 foi descrito por apresentar níveis aumentados de expressão em pacientes não tratados (Lyon *et al*, 2009), CCR5 foi relacionado com a migração de células T Reguladoras para o sítio da infecção por *P. brasiliensis* (Moreira *et al*, 2008) e o receptor de quimiocina CCR7 é descrito por ter expressão aumentada após a infecção, induzindo a migração de DC (Santos *et al* , 2011).

1.3.1.1- TLRs

Entre os PRRs, os TLRs são talvez os mais estudados. TLRs são proteínas transmembrana que trafegam entre a membrana plasmática e vesículas endossomais. Eles são os principais responsáveis para a detecção de PAMPs no ambiente extracelular. Aqueles localizados na membrana plasmática são normalmente específicos para lipídeos e proteínas hidrofóbicas, enquanto os encontrados em endossomos geralmente detectam ácidos nucleicos. Durante os últimos anos, extensas pesquisas demonstraram que TLRs são cruciais para o reconhecimento de microrganismos patogênicos e ativação de a resposta imune inata. Até o momento, 12 membros da família TLR foram identificados em mamíferos (Akira, 2011).

Os ligantes de Toll podem ser categorizados em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Todos os ligantes TLR são potentes adjuvantes imunológicos que podem desencadear uma resposta imune vigorosa. Portanto, TLRs são também referidos como receptores de adjuvantes. O ligante mais potente e o primeiro a ser identificado foi lipopolissacarídeo (LPS). LPS é encontrado na

parede celular externa de bactérias Gram-negativas e é reconhecido por TLR4 (Akira, 2011).

TLR 1, 2, 4, 5 e 6 são principalmente expressos na superfície celular e reconhecem PAMPs derivados de bactérias, fungos e protozoários, enquanto que TLR 3, 7, 8 e 9 são exclusivamente compartimentos expressos dentro de compartimentos endocíticos e reconhecem principalmente ácidos nucleicos, PAMPs derivadas de vários vírus e bactérias (Kumar *et. al.*, 2011; Takeuchi e Akira, 2010).

TLRs reconhecem componentes microbianos diferentes. Da mesma forma, as vias de sinalização de TLRs individuais diferem umas das outras. As vias de sinalização de TLRs podem ser dependentes ou independentes de uma molécula adaptadora chamada de Gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MyD88, “differentiation primary-response protein 88”), as vias de sinalização independentes de MyD88 são regulamentadas por outra molécula adaptadora chamada de domínio adaptador contendo TIR indutor de IFN- β (TRIF, “TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ”). Células com diferentes ligantes TLR induzem padrões distintos de expressão gênica, devido às diferenças nos caminhos de sinalização entre os TLRs, através do uso seletivo de moléculas adaptadoras (Akira, 2011; Takeuchi e Akira, 2010).

Em Paracoccidiodomicose, vários estudos indicam que entre os receptores tipo TLR, os PAMPs relacionados a leveduras de *P. brasiliensis* são reconhecidas por TLR2 e TLR4, que são utilizados para ganhar a entrada em macrófagos e infectar hospedeiros mamíferos. Na verdade, leveduras de *P. brasiliensis* parecem ser reconhecidas por TLR2 e TLR4, resultando no aumento da capacidade fagocítica e secreção de óxido nítrico. Os TLRs possuem participação importante nos mecanismos efetores e reguladores da imunidade inata e adaptativa contra esses patógenos. TLR2, TLR4 e a molécula adaptadora MyD88 parecem controlar as taxas fagocíticas, migração celular, secreção de citocinas, ativação e quimiocinas, bem como, a expressão de moléculas coestimulatórias que afetam ativação das células dendríticas e sua competência como apresentadoras de antígenos (APC) para células T não comprometidas (*naïve*) (Loures *et. al.*, 2011; Calich *et. al.*, 2008a; Bonfim *et. al.*,

2009; Akira, 2011). Ainda, Valério e colaboradores sugeriram que a interação do Pb18 com neutrófilos humanos via TLR2 e TLR4 pode ser considerada um mecanismo de patogenicidade do fungo.

1.32- IMUNIDADE ADAPTATIVA

Envolvendo desenvolvimento mais lento, vida longa e altamente específica, a resposta mediada por células do sistema imune e produção de anticorpos é denominada imunidade adaptativa. Vários elementos da imunidade inata agem em conjunto para controlar o crescimento inicial de patógenos e tem profundo efeito sobre a resposta adaptativa. Além disso, alguns mecanismos mais efetores de imunidade inata são idênticos aos da imunidade adaptativa que são ativados em fases posteriores da resposta imune (Calich e Kashino, 1998).

Em PCM, acredita-se que o controle da infecção seja dependente principalmente de resposta imune celular efetiva, geralmente associada ao padrão tipo 1 da resposta imunológica, caracterizado pela síntese de citocinas que ativam macrófagos e linfócitos T CD4⁺ (Th1) e T CD8⁺, resultando na formação de granulomas compactos. A organização desta resposta imune celular permite o controle da replicação do fungo, mas formas quiescentes podem persistir no interior do granuloma (Shikanai-Yasuda *et. al.*, 2006).

Pacientes infectados que evoluem para doença, geralmente apresentam depressão da resposta tipo 1, alteração esta que, se correlaciona com a gravidade da doença. Neste contexto, formas mais graves evoluem com predomínio de resposta imunológica tipo 2, onde há maior ativação de linfócitos B, hipergamaglobulinemia e altos títulos de anticorpos específicos, cuja magnitude, em geral, esta relacionada com a gravidade e disseminação da doença. Pacientes com doença crônica de gravidade moderada apresentam uma resposta imune intermediária entre padrões Th1 e Th2. Indivíduos com PCM que vivem em áreas endêmicas que não desenvolvem a doença mostram um padrão de resposta Th1, suprimindo replicação de células fúngicas e fazendo manutenção de um equilíbrio entre o hospedeiro e parasita (Fortes *et. al.*, 2011; Shikanai-Yasuda *et. al.*, 2006).

A produção de citocinas é amplamente discutida, vários estudos em camundongos verificaram que a produção inicial de altos níveis de fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon (IFN- γ) seguidas pela secreção sustentada de IL-12 e IFN- γ , induzem um fenótipo resistente à infecção por *P. brasiliensis*. Já, a secreção discreta de TNF- α e IFN- γ , associada à produção de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , é típica de animais susceptíveis, que desenvolvem doença progressiva. Ensaios, utilizando citometria de fluxo e frequência de polimorfismos genéticos, comprovaram o importante papel das citocinas tipo Th1, sobretudo de IFN- γ , na determinação da resistência imunológica do hospedeiro contra *P. brasiliensis* (Bozzi *et. al.*, 2004; Bozzi *et. al.*, 2009; Pinzan *et. al.*, 2010; Fortes *et. al.*, 2011).

Em 2010, Pinzan e colaboradores, mostraram que a resistência de camundongos fêmea, está associada ao fator hormonal, que induz uma resposta Th1, logo, está indiretamente associada ao tipo de resposta imune celular. Foi mostrado que em camundongos fêmeas, o estrógeno influencia a produção de altos títulos de IFN- γ , TNF- α e IL-12, com produção alta de NO e baixa de IL-10 e IL-4, direcionando a resposta para Th1 e gerando deste modo menor suscetibilidade. Já em machos, por influencia de testosterona, acontece justamente o contrário, são produzidos, baixos títulos de IFN- γ , TNF- α e IL-12, com produção baixa de NO e níveis altos de IL-10 e IL-4, portanto os machos são mais susceptíveis, porque a testosterona direciona a imunidade celular para uma resposta Th2 (Pinzan *et. al.*, 2010).

Respostas imunes celulares e humorais tem sido estudadas durante o curso das diferentes formas clínicas da paracoccidiodomicose humana. No entanto, como um resultado dos diferentes estágios da doença e, às vezes, o efeito de tratamento, dados derivados a partir dos estudos de pacientes geralmente são contraditórios. Em PCM, susceptibilidade e resistência parecem estar associadas a um complexo e sutil balanço de citocinas, onde ambos os grupos Th1 e Th2 são produzidos (Castaneda *et. al.*, 1988).

Apesar da resposta imune humoral não ser aparentemente eficaz na defesa contra PCM, tanto pacientes com PCM quanto animais infectados com *P. brasiliensis*, produzem grandes quantidades de anticorpos. Os anticorpos são

potentes opsonizadores e em conjunto com o sistema do complemento, promovem a morte do fungo (Fernandes, 2011).

A PCM é caracterizada pela produção de títulos significativamente elevados de anticorpos, IgG e IgA, associados à prevalência de citocinas que suprimem granuloma. Tem havido esforços entre pesquisadores para correlacionar a classe de imunoglobulinas anti-*P. brasiliensis* detectadas em soros com a forma clínica ou o estágio do processo da doença. Há uma tendência para níveis mais elevados de IgG anti-*P. brasiliensis* entre os pacientes com a forma aguda de doença (83,4%). Por outro lado, IgG foi detectada com menor frequência em pacientes com doenças crônicas. Os anticorpos específicos para *P. brasiliensis*, nos pacientes crônicos, são, principalmente, da subclasse IgG1 (Unterkircher *et. al.*, 2004; Brummer *et. al.*, 1993).

Após o tratamento, a melhora clínica geralmente está associada à diminuição do título de IgG específica para antígenos fúngicos, estudos mostram que apenas os títulos de IgG1 se mostram altos após o tratamento com antifúngicos (Bertini *et. al.*, 2007). Os níveis de anticorpos voltam a aumentar em pacientes que tiveram recidiva, provavelmente devido ao aumento da liberação extracelular de antígenos (Reis *et. al.*, 2005).

1.4- RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Infecções e lesões teciduais induzem uma cascata complexa de eventos fisiológicos conhecida como resposta inflamatória, que promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da infecção ou injúria, mas podendo ter efeitos deletérios quando de forma exacerbada. A resposta local se inicia quando o dano tecidual e endotelial desencadeia vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, levando ao extravasamento de leucócitos para os sítios inflamados (Bertini *et. al.*, 2007).

Nas fases iniciais da inflamação, predomina como tipo celular o neutrófilo e em estágios mais tardios, monócitos e linfócitos também migram para o local, amplificando o processo inflamatório. Vários mediadores participam ativamente da resposta inflamatória, tais como as quimiocinas que realizam quimiotaxia de

leucócitos; enzimas plasmáticas, como bradicinina e fibrinopeptídeos que aumentam a permeabilidade vascular; opsoninas que induzem a opsonização de microrganismos, facilitando a fagocitose; mediadores lipídicos como prostaglandinas e leucotrienos participam do processo de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular e as citocinas induzem efeitos locais, como a indução da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, facilitando a migração de leucócitos e efeitos sistêmicos como a indução de proteínas de fase aguda (Bertini *et. al.*, 2007).

O processo inflamatório agudo nem sempre é completamente resolvido e em alguns casos, pode progredir para um quadro de inflamação crônica, como é o caso de doenças auto-imunes ou infecções causadas por microrganismos que conseguem evadir a resposta imune (Bertini *et. al.*, 2007).

A PCM é uma doença sistêmica, cuja resposta do hospedeiro ao agente infectante consiste de processo inflamatório granulomatoso crônico. A inflamação granulomatosa é um padrão distinto de reação inflamatória crônica caracterizada pelo acúmulo focal de macrófagos ativados, que geralmente desenvolvem uma aparência epitelióide. Um granuloma é um foco de inflamação crônica consistindo de agregados microscópicos de macrófagos transformados em células epitelióides cercadas por um colar de linfócitos, frequentemente, tais células epitelióides se juntam e formam gigantócitos (Zago; Bertini *et. al.*, 2007).

A formação de granulomas é reconhecida como o mais potente mecanismo de defesa do organismo contra *P. brasiliensis*. Evidências parecem indicar que o granuloma formado em função de *P. brasiliensis* está intimamente relacionado com a resposta imune do hospedeiro. Assim, o granuloma paracoccidioidal pode representar uma resposta imune-específica do hospedeiro contra o fungo na tentativa de destruir e circunscrever o parasita, para impedir a sua multiplicação (Camargo e Franco, 2000).

Entretanto, os granulomas também podem danificar o hospedeiro, pois é em seus arredores que a fibrose torna-se organizada. Esse tipo de inflamação gera ativação permanente e acúmulo de macrófagos e células T nos sítios de lesão.

As citocinas liberadas pelos macrófagos cronicamente ativados estimulam a proliferação de fibroblastos, levando ao aumento da produção de colágeno que culmina em fibrose, característica das inflamações crônicas. Esta dupla função pode estar relacionada com o tipo de granuloma formado; quando eles são compactos, são capazes de conter a multiplicação de fungos. Por outro lado, quando granulomas tornam-se frouxos, a sua função de proteção, deixa de ser efetiva e células de levedura aumentam em número, e perpetuam as respostas inflamatórias do tecido com fibrose representando sua consequência final (Cock *et. al.*, 2000; Brummer *et. al.*, 1993).

A fibrose pulmonar é uma consequência incapacitante da PCM que pode perturbar gravemente a função respiratória e comprometer o bem estar do paciente. A formação de fibrose pode levar a alterações anatômicas e funcionais dos órgãos acometidos durante a infecção, particularmente os pulmões. Além de sequelas relacionadas às lesões pulmonares, adrenais e de sistema nervoso central, o processo de fibrose decorrente do envolvimento de mucosas e pele pode causar alterações crônicas de voz (disfonia por lesão de corda vocal), obstrução laríngea com necessidade de traqueostomia, redução da rima bucal. Nas formas agudas, as sequelas mais comuns são obstrução de linfonodos abdominais com síndrome de má absorção, perda de proteínas e quadros de icterícia obstrutiva. O custo social e econômico destas complicações não tem sido adequadamente avaliado pela comunidade científica e pelas autoridades de saúde (Shikanai-Yasuda *et. al.*, 2006; Franco *et. al.*, 1998; Silva *et. al.*, 2009).

Na maioria das condições de fibrose pulmonar, citotoxicidade, inflamação e reparo podem ser desreguladas por desequilíbrio na produção de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento. O reparo de lesão pulmonar é um processo extremamente dinâmico de interseção entre imunologia, biologia estrutural e fisiologia das vias aéreas (Wilson & Wynn, 2008; Shikanai-Yasuda *et. al.*, 2006).

1.41- VASCULARIZAÇÃO

A eficiência da função pulmonar, a integridade da estrutura alveolar e o reparo tecidual, são dependentes da formação e manutenção da micro e macrovasculatura, que por sua vez, são reguladas por citocinas e fatores de crescimento (Hato *et. al.*, 2009). Entre os fatores de crescimento envolvidos nestes processos, pode-se destacar o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), um potente fator angiogênico, caracterizado por ser fundamental no desenvolvimento, manutenção e sobrevivência de células endoteliais (Marwick *et. al.*, 2006).

A remoção alternativa (*splicing*) de sequências do gene que codifica o VEGF resulta na geração de pelo menos, cinco variantes moleculares que diferem pelo número total de aminoácidos. Nos seres humanos, estes correspondem a VEGF₁₂₁, o VEGF₋₁₄₅, o VEGF₁₆₅, VEGF₋₁₈₉ e do VEGF₋₂₀₆, dos quais, a variante VEGF₁₆₅ é a forma predominante. VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅ são secretadas em forma solúvel, e VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ permanecem superfície da célula associada ou são primariamente depositados na matriz extracelular (Korpany, 2010).

A expressão de VEGF é regulada por hipóxia, o qual ocorre, por exemplo, durante expansão do tumor e isquemia. A importância do VEGF no desenvolvimento vascular é destacada pelo fato de que a perda de um único alelo de VEGF- resulta em desenvolvimento anormal de vasos sanguíneos e morte embrionária. No pulmão, células endoteliais da microvasculatura produzem quantidades significativas de VEGF, o que contribui para manutenção da homeostase dentro dos pulmões (Cross e Claesson-Welsh, 2001, Abadie *et. al.*, 2005). Vários produtos gênicos são ativados em função do VEGF, que desempenha um papel contributivo na angiogênese, no crescimento da célula endotelial e sob condições específicas, é um fator de permeabilidade potente. O conhecimento do escopo das ações de VEGF nas células endoteliais expandiu-se significativamente com a identificação de funções pró-sobrevivência deste fator de crescimento *in vitro* (Voelkel *et. al.*, 2006; Ferrara e Davis-Smyth, 1997).

No pulmão, os efeitos biológicos de VEGF são mediados pela sua ligação à receptores específicos, expressos na superfície celular, VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR/FIk-1). Os receptores de VEGF apresentam uma estrutura formada por um domínio extracelular compreendendo sete domínios de Ig, um domínio transmembrana, seguido por um domínio quinase que é dividido em duas partes pela da inserção de uma sequência residual não catalítica de 100-aminoácidos, e uma cauda C-terminal. VEGFR-1 e VEGFR-2 são principalmente, expressos em células endoteliais, embora outros tipos de células de origens hematopoiéticas ou de outra natureza também possam expressar estes receptores (Cross e Claesson-Welsh, 2001; Marwick *et. al.*, 2006; Ferrara e Davis-Smyth, 1997).

A ligação de VEGF induz a fosforilação de VEGFRs, ativando uma cascata de sinalização que resulta em migração celular, proliferação e sobrevivência de células endoteliais (Marwick *et. al.*, 2010). De acordo com Kasahara (2000) e Edirisinghe (2008), o VEGF pode desempenhar um papel mais importante e representar maiores efeitos na sobrevivência de células endoteliais pulmonares quando ligado VEGFR-2 (KDR/FIk-1) do que ao VEGFR-1 (Flt-1) (Kasahara *et. al.*, 2000; Edirisinghe *et. al.*, 2008). Ainda, de acordo com Voelkel (2006), a sinalização VEGF-VEGFR-2 medeia a neovascularização, desempenhando um papel importante na manutenção da estrutura pulmão e está envolvida em vários processos-chave durante a migração e proliferação de células endoteliais, na formação de novos capilares, na restituição da barreira sanguínea em alvéolos, na manutenção estrutural do pulmão adulto e na regeneração de tecidos (Voelkel *et. al.*, 2006; Edirisinghe *et. al.*, 2008; Jakkula *et. al.*, 2000).

A enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) desempenha um papel central na manutenção da integridade vascular e é ativada por VEGF através da sinalização de sua ligação com VEGFR-2. A atividade de VEGF afeta profundamente várias propriedades funcionais de células endoteliais e é altamente relevante para a função e propriedades pulmonares vasculares, tais como síntese de óxido nítrico (NO), que é um mediador essencial da migração da célula endotelial e da angiogênese (Bird, 2011; Edirisinghe *et. al.*, 2008; Cerqueira e Yoshida, 2002).

VEGF ativa a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) que por sua vez medeia os efeitos pró-angiogênicos de VEGF (Voelkel *et. al.*, 2006; Edirisinghe *et. al.*, 2008). Considera-se o NO produzido a partir da eNOS como o responsável pela homeostase das vias aéreas. O NO mantém o calibre brônquico e regula a frequência dos movimentos ciliares na circulação pulmonar e equilibra a relação ventilação-perfusão (Filho E Zilberstein, 2000). Estudos mostram que os níveis de eNOS nos pulmões de camundongos expostos ao cigarro ou tratados com inibidor de VEGFR-2 diminuíram, prejudicando a migração e a angiogênese induzida por VEGF e consequentemente causando estresse oxidativo e disfunção endotelial (Edirisinghe *et. al.*, 2008).

A. sinalização desregulada de VEGF é encontrada na fisiopatologia de várias doenças, tais como, a asma, hipertensão, enfisema pulmonar, entre outras. Várias linhas de investigação revelam que a inibição das vias de sinalização VEGF-VEGFR-2 resulta em alveolarização pulmonar e densidade arterial diminuída (Edirisinghe *et. al.*, 2008). Korpanty e colaboradores (2010), e Paule e colaboradores (2010) mostraram que no câncer, a expressão de VEGF está significativamente aumentada, enquanto, Marwick e colaboradores (2010) mostraram que nos pulmões de ratos expostos à fumaça de cigarro, a sinalização de sobrevivência (VEGF-VEGFR-2) é diminuída. Voelkel e colaboradores (2002) ainda evidenciaram que o VEGF controla o remodelamento arterial na hipertensão pulmonar grave (Voelkel *et. al.*, 2002; 2010; Marwick *et. al.*, 2010).

Várias doenças que causam lesões pulmonares são descritas por induzir expressão e sinalização anormal de VEGF e VEGFR-2, e consequentemente, prejudicam o funcionamento pulmonar. Entretanto, não há estudos relacionando ao os efeitos da infecção pulmonar causada por *P. brasiliensis* na expressão e sinalização dessas moléculas.

1.5- MORTE CELULAR

O desenvolvimento dos organismos multicelulares dependem de uma interação entre as células que o constituem. A manutenção da homeostasia tecidual é assegurada por diferentes mecanismos biológicos reguladores, entre os quais

está a apoptose. A palavra apoptose é de origem grega e foi introduzida para descrever uma forma específica de morte celular e também é referida como morte celular programada (PCD), um processo ativo e dependente de energia (Grivicich *et. al.*, 2007; Parolin & Reason, 2001).

A apoptose é um mecanismo biológico regulado e necessário para remover células supérfluas, mutantes ou moderadamente prejudicadas e também é o maior mecanismo de morte celular frente a agentes tóxicos. O desequilíbrio da apoptose é relatada no mecanismo de várias patologias (Parolin e Reason, 2001; Grivicich *et. al.*, 2007).

Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. Organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares (Richard, 2001; Perl *et. al.*, 2005). A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes tóxicos (Grivicich *et. al.*, 2007).

A apoptose é orquestrada por uma família de cisteíno proteases (enzimas que possuem uma cisteína no sítio ativo) conhecidas como caspases (cysteine-dependent aspartate-specific proteases), estas possuem a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato, e atualmente, cerca de 14 caspases de mamíferos já foram identificadas (Slee *et. al.*, 2001; Boatright e Salvesen, 2003).

As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios. Após um sinal de morte celular, as caspases são ativadas por clivagem proteolítica e podem interagir com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que contenham domínios de morte (*death domain*). Após ativação, estas enzimas sinalizam a apoptose clivando seus substratos, o que por sua vez leva à condensação, fragmentação nuclear, externalização de

fosfolipídios de membrana. Todos esses eventos em conjunto irão sinalizar para que a célula seja fagocitada por macrófagos (Boatright e Salvesen, 2003).

As caspases podem ser classificadas de acordo com seu pró-domínio e seu papel na apoptose. Caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos e estão envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Caspases efetoras apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis pela clivagem de substratos. Entre as caspases, a Caspase 3 é a mais bem estudada e com mecanismos melhor descritos na literatura, esta enzima apresenta possivelmente o papel mais importante como executora na apoptose (Cohen, 1997; Hengartner, 2000; Boatright e Salvesen, 2003).

Existem duas vias de morte celular programada: a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de TNF. Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases. A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma sequência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular". Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD (MORT-1), (Fas Adaptor Death Domain). Essa molécula tem a capacidade de recrutar caspase-8 que irá ativar caspase-3, enzima executora de morte por apoptose (Hengartner, 2000; Cohen, 1997; Boatright e Salvesen, 2003; Slee *et. al.*, 2001).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais são transduzidos em resposta a estes estresses que convergem principalmente para a mitocôndria. Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes. Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam à ruptura da organela e consequente liberação de proteínas pró-

apoptóticas para o citoplasma. Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio, há a perda de homeostasia celular. A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Além disso, é sabido que as espécies reativas de oxigênio induzem a ativação das caspases -9 e -3 (Perl *et. al.*, 2005; Hengartner, 2000; Slee *et. al.*, 2001; Cohen, 1997).

Devido a ativação da proteólise de caspases ser irreversível, este processo é altamente regulado pelas células. Para evitar danos fisiológicos, as células inibem ou degradam as caspases (Pop & Salvesen, 2009).

1.6- PB27R

P. brasiliensis sintetiza inúmeros antígenos que interagem com o sistema imune. Quando o fungo invade os tecidos, o hospedeiro é exposto a um complexo de antígenos fúngicos, incluindo as proteínas, glicoproteínas, e glicosíngolipídeos, a interação de seus antígenos com o sistema imune do hospedeiro causa uma resposta imunológica que exerce influência fundamental no resultado da infecção. Durante a infecção, células-B são ativadas e secretam anticorpos específicos para vários antígenos que podem ser facilmente detectados em soros a partir de pacientes com PCM. A análise de anticorpos mostra níveis elevados de IgG na doença progressiva, aguda ou disseminada (Camargo e Franco, 2000; Reis *et. al.*, 2005, Cavassani *et. al.*, 2011).

O estudo de preparações antigênicas do filtrado de cultura do fungo (exoantígenos) ou das células lisadas (antígeno total) tem sido feito em busca de melhorar não só o conhecimento químico dessas moléculas, mas também para caracterizar a reatividade imunológica induzida por eles em pacientes com PCM. Os antígenos extracelulares fazem o primeiro contato com as células do hospedeiro e, portanto, desempenham um papel fundamental no processo infeccioso da PCM, (Fernandes, 2011). Entre os antígenos de *P. brasiliensis*, atualmente, o mais estudado e utilizado em métodos sorológicos é a proteína gp43, um antígeno imunodominante que teve sua sequência nucleotídica

clonada e caracterizada por Cisalpino e colaboradores (Camargo e Franco, 2000; Cisalpino e Travassos, 1996). Embora os ensaios de aplicação de gp43 terem se mostrado úteis para o diagnóstico de PCM, outros antígenos também devem ser considerados, além disso, novos antígenos de *P. brasiliensis* têm sido descobertos por vários pesquisadores, como alternativa para formulação de novas vacinas e novos ensaios para diagnóstico (Bozzi *et. al.*, 2004; Diniz *et. al.*, 2004). Em função disso, ao longo dos anos vários antígenos foram clonados e caracterizados (Cisalpino e Travassos, 1996; McEwen *et. al.*, 1996; Martins *et. al.*, 2009).

Entre os antígenos de *P. brasiliensis*, é de notável destaque a proteína Pb27, que é um antígeno amplamente estudado e que tem demonstrado grande potencial como indutor de resposta imune protetora, bem como, marcador para imunodiagnóstico da PCM.

Em 1996, McEwen e colaboradores, clonaram e sequenciaram uma região genômica de *P. brasiliensis* que codificava uma proteína antigênica de aproximadamente 27 kDa, essa proteína foi denominada P27, devido ao seu peso molecular (McEwen *et. al.*, 1996). A proteína recombinante foi utilizada por Ortiz e colaboradores (1998), em ensaios de ELISA para detecção de anticorpos reativos a ela em soros de pacientes com PCM e como antígeno em testes de dot blot por Correa e colaboradores (2006). Nestes ensaios, soros de pacientes com PCM, reconheceram a proteína com boa sensibilidade

Em 2008, no laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFMG, Reis e colaboradores, sequenciaram, clonaram e avaliaram a atividade protetora de uma proteína com peso molecular de 27 kDa (Pb27), constituinte da fração F0 do antígeno total de *P. brasiliensis* (PbAg), a mesma proteína caracterizada por McEwen em 1996. Os resultados da avaliação da atividade protetora de Pb27 mostraram que a imunização de camundongos BALB/c a proteína (Pb27r), induziu uma resposta imune que promoveu efeito protetor contra formas de leveduras altamente infectantes de *P. brasiliensis*. Além disso, a imunização demonstrou modificar a evolução da infecção em camundongos infectados, promovendo uma infecção pulmonar controlada, associados a baixas taxas de mortalidade e à presença de um granuloma compacto. Anticorpos específicos

obtidos desses animais imunizados com a Pb27r foram capazes de localizar a proteína na superfície e no citosol de células leveduriformes do fungo (Reis *et al.*, 2008).

Em 2011, Fernandes e colaboradores, demonstraram que a imunização com rPb27 combinada à quimioterapia com Fluconazol, foi eficaz para evitar disseminação do fungo para baço e fígado de camundongos e para controlar o crescimento de leveduras no pulmões. Os níveis de anticorpos específicos também foram avaliados e a imunização de camundongos com rPb27 induziu níveis significativos de todos os isotipos.

Quando esta imunização foi combinada com o Fluconazol, camundongos desenvolveram PCM pulmonar restrita associada a baixas taxas de mortalidade e produção de significativa de IgG1, IgG2a e isotipos de IgG2b, com uma pequena produção de IgG3. Isto evidenciou que a imunização com rPb27 promove proteção antifúngica melhorada pelo Fluconazol, diminuindo a carga fúngica em pulmões e evitando a disseminação do fungo para outros sítios de infecção (fígado e do baço) (Fernandes *et al.*, 2011b; Fernandes *et al.*, 2011c).

Ainda em 2011, Fernandes e colaboradores, mostraram a eficiência do uso combinado dos antígenos recombinantes de *P. brasiliensis* rPb27 e rPb40 em um ensaio imunoenzimático para o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose, e como a associação da Pb27 com o quimioterápico Fluconazol aumenta os efeitos da quimioterapia na paracoccidiodomicose experimental (Fernandes *et al.*, 2011b, Fernandes *et al.*, 2011c).

II. JUSTIFICATIVA

Em paracoccidioidomicose a infecção primária geralmente ocorre nos pulmões, onde pode envolver destruição dos alvéolos, interstício e árvore brônquica, (Silva *et. al.*, 2006). A presença de *P. brasiliensis* no tecido causa lesões resultantes da atividade imunológica do organismo, podendo, inclusive, prejudicar a troca gasosa pulmonar, esse quadro evolui com o tempo e se consolida para formar uma série de processos crônicos granulomatosos, resultando em disfunção ventilatória e hipoxemia, podendo ainda, levar a insuficiência pulmonar crônica, resultante do desenvolvimento de fibrose, que ocorre simultaneamente com o processo inflamatório e infiltração de leucócitos (Silva *et. al.*, 2009).

No ano de 2008, o laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFMG, sequenciou, clonou e avaliou a atividade protetora de uma proteína com peso molecular de 27 kDA (Pb27), constituinte da fração F0 do antígeno total de *P. brasiliensis* (PbAg). Esta proteína já havia sido anteriormente caracterizada por McEwen e colaboradores (1996), e estudada para diagnóstico de PCM por Correa e colaboradores (2006). Os resultados da avaliação da atividade protetora de Pb27 mostraram que a imunização de camundongos BALB/c com Pb27r induziu uma resposta imune protetora contra formas de leveduras altamente infectantes de *P. brasiliensis*. A imunização com Pb27r demonstrou modificar a evolução da infecção em camundongos infectados, promovendo uma infecção pulmonar controlada, associada a baixas taxas de mortalidade e à presença de um granuloma compacto (Reis *et. al.*, 2008)

Recentemente, Fernandes e colaboradores (2011), mostraram os efeitos aditivos da associação entre imunização e a quimioterapia com Fluconazol contra *P. brasiliensis* (Fernandes *et. al.*, 2011b). Contudo, os mecanismos através dos quais a proteína Pb27r promove a redução do processo inflamatório pulmonar e a proteção deste tecido na infecção por *P. brasiliensis* ainda não foram descritos.

Em função disso, este trabalho, a partir da comparação da resposta inflamatória gerada pela infecção com *P. brasiliensis* em camundongos

imunizados e não imunizados com a Pb27r, fornecerá importantes informações sobre como essa proteína modula a resposta inflamatória. Além disso, este estudo proverá subsídios adicionais sobre atividade protetora de Pb27r e auxiliará na investigação dos métodos induzidos pela imunização para restauração das lesões causadas por *P. brasiliensis*.

Assim, este trabalho tem o intuito de melhorar o entendimento sobre a reatividade imunológica e inflamatória induzida pela infecção por *P. brasiliensis* e sobre a resposta protetora gerada pela Pb27r nos pulmões dos camundongos, fornecendo melhor embasamento para o uso futuro desta proteína como vacina contra PCM.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar resposta inflamatória em pulmões de camundongos imunizados com Pb27r e submetidos à infecção desafio por *P. brasiliensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a atividade protetora da proteína recombinante Pb27 após infecção desafio em camundongos BALB/c.
- Avaliar o desenvolvimento de processos fibróticos e granulomatosos frente à infecção por *P. brasiliensis*.
- Avaliar os sinais de sobrevivência celular pela expressão de VEGF e do receptor VEGFR-2, entre os grupos experimentais.
- Avaliar a expressão de TLRs 2 e 4 nos pulmões dos animais imunizados e infectados.
- Avaliar os níveis de morte celular pulmonar a partir da detecção de Caspase 3 ativa.
- Comparar níveis de expressão de eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e iNOS (óxido nítrico sintase induzível), entre os grupos experimentais após a infecção desafio.
- Avaliar a produção de citocinas pró e anti-inflamatória no pulmão dos animais após infecção desafio.
- Estudar os níveis de receptores de quimiocina CCR7 no pulmão durante a infecção.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. A PROTEÍNA Pb27

A proteína recombinante de 27 kDA (Pb27), constituinte da fração F0 do antígeno total de *P. brasiliensis* (PbAg), já havia sido sequenciada e clonada no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) da UFMG sob orientação do Professor Alfredo Miranda de Góes. Os clones de bactérias *E. coli* BL21 contendo o inserto correspondente a proteína Pb27 foram mantidos à (- 80 °C) em meio Luria-Bertani (LB) /glycerol no LICM. A proteína purificada foi gentilmente cedida pelas alunas de Doutorado do LICM, Viviane Cristina dos Santos e Juliana Barbosa e foi preparada de acordo com os métodos publicados anteriormente (Reis *et. al*, 2008; Ferandes *et. al*, 2011).

4.1.2. - MICRORGANISMO- *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

A cepa de *P. brasiliensis* PB18 utilizada nesse trabalho foi cedida pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Carlos Pelleschi Taborda do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantida, por repiques semanais, em meio de cultura YPD Agar (0.5% extrato de levedura, 0.5% peptona A, 1.5% D-glucose, 1.5% agar), à 37°C. O fungo foi utilizado após passagens em animais para manutenção de sua virulência. Essas passagens foram feitas por três vezes até a utilização desse fungo na PCM experimental.

4.2 - PCM EXPERIMENTAL

A linha do tempo referente aos experimentos efetuados neste trabalho pode ser visualizada na Figura A.

4.2.1 - IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Grupos de camundongos BALB/c machos com 6-8 semanas foram imunizados com a proteína Pb27r. O antígeno foi emulsificado com adjuvante composto de 1mg/camundongo de Al(OH)₃ (Pepsamar – Sanosi-synthelado, RJ) e 100µg/camundongo de *Corynebacterium parvum* (R.V. manipulações

especiais, RJ) e 50 ug /camundongo de Pb27r. Cada animal imunizado recebeu 150 µl dessa emulsão que foi inoculada por via subcutânea em intervalos de 15 dias em um total de 3 imunizações. Grupos controle foram inoculados apenas com o adjuvante ou não sofreram intervenções. O Al(OH)₃ é descrito como sendo capaz de induzir, tanto em humanos como em modelos experimentais, uma alta produção de imunoglobulinas e de IL-4, característicos de uma resposta tipo Th2 (Lindblad, 2004). Já o *C. parvum* é um importante estimulador da resposta imune celular (Th1), induzindo a produção de IFN-γ e ativação de células T CD4 e CD8 positivas em camundongos (Soong, 1995).

4.2.2 - INFECÇÃO INTRATRAQUEAL

Camundongos BALB/c machos com 6-8 semanas foram inoculados por via intratraqueal, com uma preparação fúngica contendo a cada 50 µl 3×10^5 células leveduriformes de *P. brasiliensis* Pb18, em PBS 0,15M estéril. A viabilidade fúngica foi calculada pela coloração com verde Janus e só foram utilizadas preparações fúngicas com viabilidade superior a 90%. Os animais foram anestesiados com uma solução composta de 43% de xilazina (Dopaser solução injetável, Laboratório Calier do Brasil LTDA, SP) e 57% de quetamina (Dopalen injetável, Vetbrands, SP), da qual foi aplicado 40 µl/animal. Os animais foram então submetidos a uma pequena cirurgia, a qual foi feito um corte no pescoço do animal para exposição da traquéia, foi inoculado o volume de 50 µl da preparação fúngica. O corte foi suturado com fio de sutura de nylon. Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), sob o protocolo número: **203/10** (ANEXO I).

4.2.3 - TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS

Grupos de camundongos previamente infectados com *P. brasiliensis* pela via intratraqueal foram submetidos ao tratamento com Fluconazol (Mantena laboratories limited), 10mg/Kg diluído em soro fisiológico por via intraperitoneal com intervalos de 24 horas por 30 dias, o tratamento teve início após 30 dias de infecção. O Fluconazol foi o medicamento escolhido para ser utilizado neste

trabalho porque é um medicamento solúvel, portanto, de fácil administração, bem como, porque apresenta atividade significativa em PCM humana e em trabalhos anteriores se mostrou relativamente eficiente no tratamento de camundongos infectados com *P. brasiliensis* (Visbal *et. al.*, 2005; Marques *et. al.*, 2006).

4.2.4 - PONTOS DE EUTANÁSIA:

Os animais sofreram eutanásia 30 e 90 dias após a infecção e estas datas ficaram determinadas como primeiro e segundo pontos de morte (1PTM E 2 PTM, respectivamente).

4.2.5 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização do experimento, camundongos BALB/c machos de 6 a 8 semanas foram divididos em 6 grupos compostos de 12 camundongos cada. Os grupos foram divididos em: **Controle negativo (CN)**: composto por animais que não sofreram intervenções. **Controle positivo (CP)**: composto por camundongos apenas infectados com a cepa *P. brasiliensis* (Pb18). **adjuvante (ADJ)**: composto por camundongos inoculados apenas com adjuvante (*C. parvum* e Al (OH)3) durante o período de imunização e posteriormente infectados com Pb18. **tratado (TRAT)**: composto de camundongos infectados com Pb18 e posteriormente tratados com Fluconazol; **imunizado (PB27)**: composto de camundongos imunizados com a proteína Pb27r na presença de adjuvante e posteriormente infectados com Pb18. **imunizado/tratado (PB27+TRAT.)**: composto de camundongos imunizados com a proteína Pb27, posteriormente infectados com Pb18 e tratados com Fluconazol após a infecção. Esses grupos encontram-se esquematizados na Tabela I.

4.2.6 - SOROS DE CAMUNDONGOS

Os soros de camundongos foram obtidos antes e durante as imunizações, sendo retirados 7 dias após cada imunização. Os soros, também foram coletados 7 dias antes da infecção e após a infecção desafio, nos pontos de eutanásia, que ocorreram 30 e 90 dias após a infecção.

Realizou-se a coleta de sangue (400ul/animal) por punção do plexo retro-orbital de cada animal, após a coleta o sangue foi mantido por 1 hora em temperatura ambiente e 1 hora à 4° C para separação do soro, após o período de separação o sangue foi centrifugado por 5 minutos, 3.000 RPM à 4°C e o sobrenadante foi coletado e guardado à -20°C.

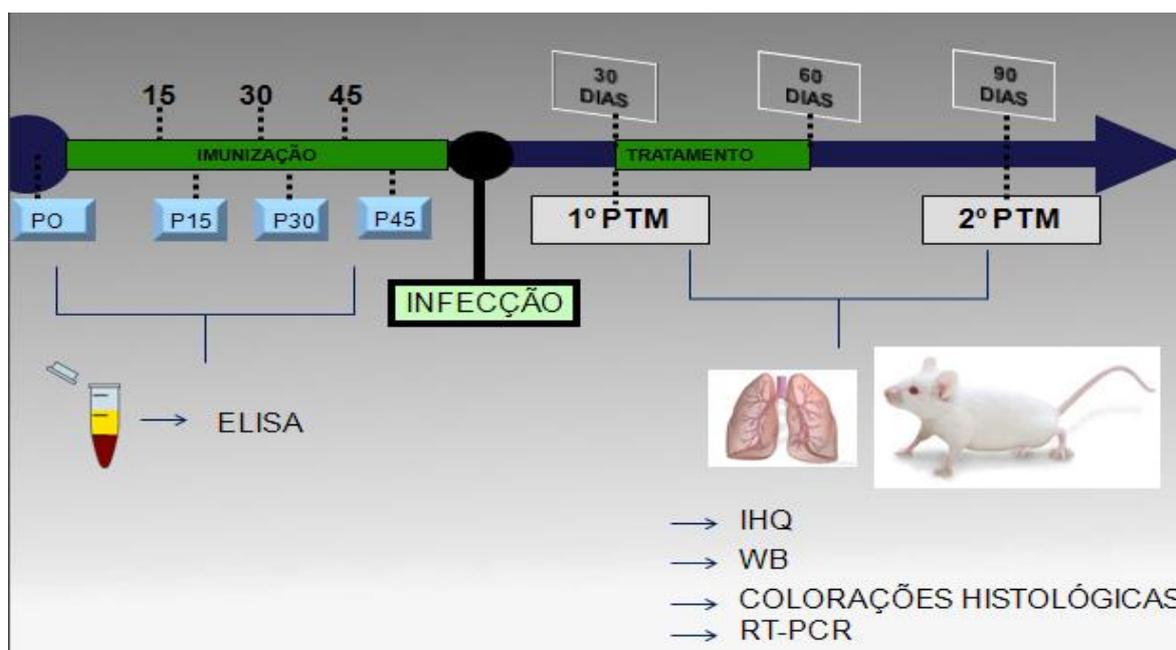


Figura A- Linha do tempo para descrição da estratégia experimental utilizada neste trabalho.

Tabela I- Grupos experimentais utilizados na PCM experimental e as intervenções por eles sofridas.

GRUPO	IMUNIZAÇÃO	INFECÇÃO	TRATAMENTO
CONTROLE NEGATIVO	NÃO	NÃO	NÃO
CONTROLE POSITIVO	NÃO	SIM	NÃO
ADJ	SIM (somente adjuvante)	SIM	NÃO
IMUNIZADO	SIM	SIM	NÃO
TRATADO	NÃO	SIM	SIM
IMUNIZADO/TRATADO	SIM	SIM	SIM

4.3 - ELISA

Os soros coletados dos camundongos durante o processo experimental foram avaliados para presença de anticorpos anti Pb27r por ELISA.

Para avaliar a reatividade dos soros dos camundongos contra a Pb27r utilizou-se placas de microtitulação de fundo chato (NUNC. Maxisorp) que foram sensibilizadas por doze horas com 100 µl de uma solução contendo Pb27r 5 µg/ml em tampão carbonato 0.5 M, pH 9.6, à 4° C.

Após incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem (0,05 M PBS contendo 0,05% Tween 20 - PBST) e bloqueadas com 200 µl de solução de bloqueio (1,6% caseína em 0,15M PBS, pH 7,4) à 37° C. Depois de 1 hora de incubação, as placas foram lavadas novamente e preenchidas com 100 µl de soro de camundongo, na diluição de 1/200 em 0,25% caseína diluída em 0,15 M PBS, pH 7,4, e incubados novamente por 1 h. Após incubação com os soros, as placas foram lavadas 10 vezes com PBS-T e incubados por mais uma hora com 100 µl de anticorpo secundário de cabra anti IgG1, IgG2a, IgG2b ou IgG3 de camundongo (Sigma), (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA) conjugados com peroxidase, na diluição de 1/10.000, em 0,25% caseína diluída em 0,15 M PBS, pH 7,4.

As placas foram então lavadas dez vezes com PBS-T e a atividade da peroxidase foi determinada com 100 µl de solução de tetrametilbenzidina (TMB) pré-corado (R&D). A revelação foi interrompida com 50 µl de Ácido Sulfúrico, H₂SO₄ 2N. A densidade ótica de 450 nm foi registrada em leitor de ELISA automático (Elx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA).

4.4 - OBTENÇÃO DE ÓRGÃOS

Os animais sofreram eutanásia após 30 e 90 dias de infecção e os pulmões, foram removidos através de necropsia. O pulmão de cada animal foi dividido em quatro partes, as quais foram utilizadas para ensaio de proteção (determinação das Unidades Formadoras de Colônia), cortes histológicos, preparação de extrato protéico e extração de RNA para PCR em tempo real.

4.5 - ENSAIO DE PROTEÇÃO

Unidades formadoras de colônias foram determinadas após 30 e 90 dias de infecção nos pulmões. Três animais por grupo/ponto de análise sofreram eutanásia e cada órgão foi plaqueado em triplicata. Para tanto, os órgãos foram removidos, pesados e homogeneizados em 1 ml de PBS 0,15M, 100 µl da suspensão foram plaqueados em ágar de infuso cérebro e coração (BHI- ágar, Difco) acrescido de 4% de soro fetal bovino e 5% de sobrenadante de cultura de Pb18, como fator de crescimento. As placas foram incubadas à 36 °C e lidas após 20 dias (Diniz *et. al.*, 2004). Os resultados foram expressos como Log₁₀ da média do número de UFCs por grama de tecido.

4.6 - HISTOLOGIA

4.6.1-FIXAÇÃO

A fração dos pulmões obtidos para histologia após eutanásia dos animais em 30 e 90 dias, foi embebida em solução de Paraformaldeído 4 % tamponado durante 7 dias, com intuito de paralisar o metabolismo celular, preservar as estruturas do tecido, evitar a autólise celular, impedir a proliferação de microrganismos e endurecer o tecido.

4.6.2 INCLUSÃO

Os órgãos foram desidratados em banhos de concentrações crescentes de etanol: 70%, 80%, 90%,100% (2x), por uma hora em cada um deles. Após a desidratação, os órgãos foram diafanizados com três banhos de uma hora em líquido miscível com o meio de inclusão (xilol/toluol). Para a inclusão fundiu-se o Paraplast em estufa à 60°C e colocou-se os órgãos embebidos na parafina líquida. Os blocos obtidos foram submetidos à microtomia. Foram feitos cortes de 5 µm de espessura que foram fixados em lâminas de vidro.

4.6.3 COLORAÇÃO

Os cortes foram corados por HE (Hematoxilina e Eosina), GROCCOTT (Prophet *et. al.*, 1992), para evidenciar a presença das células fúngicas e Tricrômico de Masson, também foram reservados para a técnica de Imunohistoquímica. As lâminas foram então analisadas por microscopia óptica, pela qual, foi feita a varredura (*screening*) das lâminas em campos sucessivos do menor para o maior aumento.

4.6.4 IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Os pulmões dos camundongos foram previamente fixados e inclusos em Paraplast como descrito nos itens 4.6.1 e 4.6.2. Foram obtidos cortes histológicos de 5 µm de espessura aderidos em lâminas silanizadas, cada lâmina contendo dois cortes histológicos. Inicialmente as lâminas foram desparafinizadas com dois banhos de xilol/toluol (um banho de 1 hora e outro consecutivo de 15 minutos) e hidratadas com banhos sucessivos de concentrações decrescentes de etanol (100%I, 100%II, 95%, 80%) 7 minutos em cada banho e com 5 banhos rápidos (10 s) em água deionizada.

Após hidratação, bloqueou-se a peroxidase endógena do tecido com H₂O₂ 10 volumes em dois banhos de 15 min. Após bloqueio da peroxidase o corte foi lavado três vezes por 5 minutos com solução Tris-HCl (Tris Base 20 mM, NaCl 141,6 mM, pH 7,4). Os cortes foram incubados com BSA 2% diluída em Tris-HCl por 1 hora para bloqueio da reação.

Posteriormente ao bloqueio, escorreu-se o BSA das lâminas e sobre um dos cortes histológicos aplicou-se o anticorpo primário de interesse contra o antígeno desejado (Os anticorpos utilizados estão listados na Tabela II), no outro corte da mesma lamina foi colocado Tris-HCl para efetuação do controle negativo da reação, na qual foi omitido o anticorpo primário, ambos os cortes permaneceram por 12 horas em câmara úmida escura à 4°C. Finalizando o tempo de incubação, foram retirados o excesso de anticorpo e Tris-HCl dos cortes e as lâminas foram lavadas em três banhos de Tris-HCl com duração de 5 min. cada banho. Então, procedendo a lavagem das lâminas foi colocado o

anticorpo secundário nos dois cortes de cada lamina, (IgG cabra anti Rabbit. Sigma ou IgG mouse anti Cabra Sigma –dependendo do anticorpo primário utilizado), que permaneceu por 1 hora em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação foi lavado em três banhos de Tris-HCl com duração de 5 min. cada banho.

A revelação da lâminas foi efetuada com Diaminobenzidina DAB (DAKO-K3468) que foi colocado sobre as lâminas (para cada anticorpo foi previamente testado o tempo de revelação que variou entre 1 e 4 minutos). Para bloquear a reação de revelação foi feito um banho rápido com Tris-HCl (2 minutos) e 5 banhos rápidos com água deionizada (10 s cada banho). Então as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris em 1 banho de 15 s e o excesso de corante foi retirado com dez banhos rápidos em água deionizada (10s cada banho). Finalizando este procedimento, as lâminas foram desidratadas com banhos sucessivos de concentrações crescentes de etanol (70%,90%,100%I, 100%II, 100%III) 10 minutos cada banho e diafanizadas com 2 banhos de 10 minutos cada em Xilol/Toluol. A montagem das lâminas foi efetuada com Entellant (MERK).

4.7 -EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

As frações dos pulmões obtidos para extrato protéico após eutanásia dos animais em 30 e 90 dias, foram colocadas em tampão de lise celular, constituído por: NaCl 100mM, Tris base 50mM, Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 5mM, Pirofosfato de sódio decahidratado 50mM, Cloreto de Magnésio 1M, Nonidet P40(1%), Triton (0.30%), Sódio Desoxicolato (0,50%), Fluoreto de Sódio 20 mM e um coquetel completo de Inibidor de Protease (Sigma), 2%, em uma proporção de 50 µl de tampão de lise para cada 0,1g de pulmão.

Os órgãos permaneceram durante 12 horas neste tampão e foram macerados à 4°C. e centrifugados a 13.200 RPM, 15min à 4°C. O sobrenadante foi coletado e quantificado pelo método de Bradford descrito no item 4.7.1. Os extratos protéicos foram utilizados em Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS/PAGE (Item 4.8) e em Western Blot (Item 4.9) .

4.71 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

A dosagem das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Comassie brilliant blue” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve luz fortemente em 595 nm (Zaia *et. al.*, 1998).

As amostras de 20µl em diferentes diluições foram distribuídas em triplicata em placas de 96 poços e 180 µl de 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) foram adicionados a elas. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Elx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) no modo Absorbância à 595 nm, e os valores obtidos comparados com uma curva padrão de BSA 0,5 µg; 1,0 µg e 1,5 µg; 2,0µg.conforme a fórmula: [] proteína = Abs x Fc x Fd x Cv. No qual: (Abs: média das leituras das amostras em triplicata; 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.) (Zaia *et. al.*, 1998).

4.7.2 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA – SDS/PAGE

A análise eletroforética de proteínas foi realizada em géis de poliacrilamida com SDS, como descrita por Laemmli (1970), utilizando o sistema da Bio-Rad. As proteínas foram adicionadas ao tampão da amostra (Tris-HCl 0,065 M, pH 6.8, SDS 2%, β-mercaptoetanol 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,002%), e separadas em géis contendo poliacrilamida (6 à15% dependendo do peso molecular da proteína), bis-acrilamida (0,26%) e SDS (0,1%), em Tris-HCl 0,375 M, pH 8.8. O gel de concentração foi constituído de poliacrilamida (3%), bis-acrilamida (3%) e SDS (0,1%), em Tris-HCl 0,125 M pH 6.8.

Os géis de separação e concentração foram polimerizados na presença de persulfato de amônio (0,1%) e TEMED (1:2.000, v/v). A separação foi feita em tampão de corrida constituído de Tris (0,025 M), glicina (0,192 M) e SDS (0,1%), pH 8.3 em uma voltagem constante de 80 V. Após a eletroforese, os géis foram corados por azul de Coomassie (Item 4.8.1), ou então transferidos para membrana de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF) (Item 4.8.2).

4.7.3 - COLORAÇÃO DO GEL:

O gel foi incubado por duas horas em solução 15% metanol, 7% ácido acético e 0,5% "Coomassie Brilliant Blue" R250. A seguir a solução 10% metanol 5% ácido acético foi utilizada para a remoção do excesso de corante. O gel foi então fotografado.

4.7.4 - ELETROTRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS – “WESTERN BLOT (WB)”

Após a corrida eletroforética da proteína de interesse, o gel foi colocado sobre a membrana de PVDF (Millipore), e ambos foram colocados sobre papel extra-grosso, 7 x 8.4 cm para sistema de transferência semi seco (Bio-Rad). O sanduiche foi embebido em tampão de Transferência (Tris 0,025M, glicina 0,192 M e metanol 20%, pH 8,3). e colocado no sistema “*Trans-Blot Semi Dry Electrophoretic Transfer Cell*” (Bio-Rad), para eletrotransferência de proteínas, sendo submetido à voltagem constante de 20V durante 1 hora e 30 minutos. Após ser retirada do sistema, a membrana foi bloqueada por 1 hora com leite em pó desnatado (Molico) 5% diluído em tampão Tris-buffer saline acrescido de tween 20 (TBS-T): composto por Tris base 20 mM pH 8,0, NaCl 150 mM e Tween 20, 0.05%. Após bloqueio, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo primário específico para a proteína a ser detectada (IgG anti camundongo), diluído em TBST contendo 5 % de leite em pó . Os anticorpos utilizados no experimento estão listados na Tabela II. Após incubação com o anticorpo primário a membrana foi lavada durante 5 minutos por três vezes com TBS-T. Procedeu-se 1 hora de incubação com anticorpo secundário anti-imunoglobulina conjugado à peroxidase, (Anti Rabbit IgG- molécula inteira-conjugado com peroxidase Sigma ou Anti Cabra IgG –molécula inteira-

conjugado com peroxidase Sigma, dependendo do anticorpo primário utilizado) na diluição de 1:10.000 em TBS-T contendo 5% de leite em pó, após a incubação a membrana foi lavada durante 5 minutos três vezes com TBS-T. Após as lavagens, foi aplicado sobre a membrana 1 mL do reagente de detecção “*Immobilon Western chemilumnescent HRP substrate*, Millipore) que agiu durante 5 minutos em ausência de luz. A membrana foi colocada sobre uma transparência em cassete de revelação (KODAK) e na câmara escura o filme foi exposto à membrana. Após a exposição do filme à membrana, o mesmo foi retirado do cassete e banhado sob agitação em solução reveladora (revelador KODAK -8969735) até o aparecimento de bandas, lavado rapidamente em água e colocado em solução fixadora (fixador KODAK-172.5662). Após secagem o filme revelado foi digitalizado.

TABELA II- Anticorpos utilizados nos experimentos de IHQ e WB.

Anticorpo	Número de catálogo	alvo	Marca
Rabbit Anti VEGF	sc152	VEGF	Santa Cruz
Rabbit Anti active Caspase 3	ab13847	CASPASE 3	Abcam
Goat Anti CCR7	ab1657	CCR7	Abcam
Rabbit Anti TLR-4	ab13556	TLR-4	Abcam
Rabbit .Anti TLR2	ab24192	TLR-2	Abcam
Rabbit Anti Colágeno I	ab292	COLÁGENO I	Abcam
Rabbit Anti VEGFR	Ab39638	receptor de VEGF	Abcam
Rabbit Anti GAPDH	sc25778	GAPDH	Santa Cruz

4.8 - PCR EM TEMPO REAL

Ensaio de PCR em tempo real foram realizados para quantificar especificamente os transcritos descritos na Tabela III. Para isso, pulmões foram removidos dos camundongos após 30 e 90 dias de infecção por *P. brasiliensis*, e misturados com o reagente Trizol (Life Technologies) e congelados a - 80°C. O RNA total foi extraído de acordo com as instruções do fabricante. Após as extrações, as amostras foram tratadas por 30 minutos com DNase livre de RNase (Promega) e purificadas com Fenol-Clorofórmio. A concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000 a 260nm (Thermo Scientific). A qualidade do material nucléico

extraído foi avaliada pela relação OD 260/OD 280 > 1,6 e as concentrações finais das amostras foram padronizadas em 0,2 mg/mL. O RNA extraído foi utilizado para a produção de cDNA com o Kit Fermentas Life sciences, RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis, seguindo as recomendações do fabricante.

As sequências dos iniciadores específicos para os transcritos e para o gene constitutivo β -actina e das citocinas foram obtidos a partir do trabalho de Giulieti e colaboradores (2001), os demais foram construídos e analisados através do site www.idtdna.com e pelo programa FAST-PCR.

Após síntese de cDNA foi feita para cada gene, uma curva de eficiência que determinou a melhor concentração de cDNA a ser utilizada com 5-10 pmol do iniciador específico. As reações de PCR foram realizadas utilizando o reagente Syber®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), segundo as instruções do fabricante. Para cada reação foram utilizados entre 5 e 10 pmol do iniciador específico e todas as reações foram feitas em triplicata. Foi utilizado o modo delta delta CT e os resultados representam a quantificação relativa da expressão gênica normalizada em relação ao gene constitutivo β -actina (Giulieti *et. al.*, 2001). As reações de PCR em tempo real foram feitas e analisadas utilizando-se o sistema de detecção ABIPrism 7900 (Applied Biosystems).

4.9 - TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os resultados foram analisados através do teste One way ANOVA com teste posterior de Bonferroni nos experimentos envolvendo animais, utilizando o programa Prism 5.0 (GraphPad, CA – USA). A significância foi considerada quando $p < 0,05$.

TABELA III: Sequências dos iniciadores utilizados no RT-PCR.

PRIMER	CADEIA	SEQUÊNCIA 5' -3'
eNOS	Foward	CAA CGC TAC CAC GAG GAC ATT
	Reverse	CTC CTG CAA AGA AAA GCT CTG G
iNOS	Foward	CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT
	Reverse	CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG
IFN- γ	Foward	TCT GGA GGA ACT GGC AAA AG
	Reverse	TTC AAG ACT TCA AAG AGT CTG AAG
IL-10	Foward	GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA
	Reverse	ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT
IL-4	Foward	ACA GGA GAA GGG ACG CCA T
	Reverse	GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA
IL-6	Foward	GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC
	Reverse	AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA
TNF- α	Foward	CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A
	Reverse	TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC
TGF- β	Foward	CAC GTC GTA GCA AAC CAC CAA GTG GA
	Reverse	TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G
TLR4	Foward	GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC
	Reverse	AGG GAC TTT GCT GAG TTT CTG ATC
VEGF	Foward	GGC AGC TTG AGT TAA ACG AAC
	Reverse	TGG TGA CAT GGT TAA TCG GTC
VEGFR	Foward	ATA GAA GGT GCC CAG GAA AAG
	Reverse	TCT TCA GTT CCC CTT CAT TGG
B-ACTINA	Foward	GGA TGC AGA AGG AGA TTA CTA CTG
	Reverse	CGA TCC AGA GAG AGA GTA CTT G

V. RESULTADOS

5.1-DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

A produção de anticorpos IgG específicos anti Pb27r foi avaliada através de ensaios de ELISA. A avaliação dos níveis de anticorpos IgG anti Pb27r antes e após cada imunização, possibilitou observar que, a partir da segunda imunização, níveis significativamente superiores de anticorpos IgG anti Pb27r foram detectados nos soros dos animais imunizados (PB27) em relação a camundongos não imunizados (CN) e imunizados apenas com o adjuvante (ADJ) (Figura 1).

Uma vez que a imunização com a proteína Pb27r induziu a produção de altos níveis de IgG, foram realizados ensaios de ELISA, para determinar quais subclasses de IgG foram predominantes durante o período de imunização. Os resultados encontram-se representados na Figura 2. Após a terceira imunização, níveis significativos de anticorpos específicos IgG1 (Figura 2A), IgG2a (Figura 2B) e IgG2b (Figura 2C) anti Pb27r foram detectados nos soros de camundongos imunizados (PB27), em relação aos camundongos não imunizados (CN) e imunizados apenas com o adjuvante (ADJ). Não houve diferença nos níveis de IgG3 entre os grupos (Figura 2D).

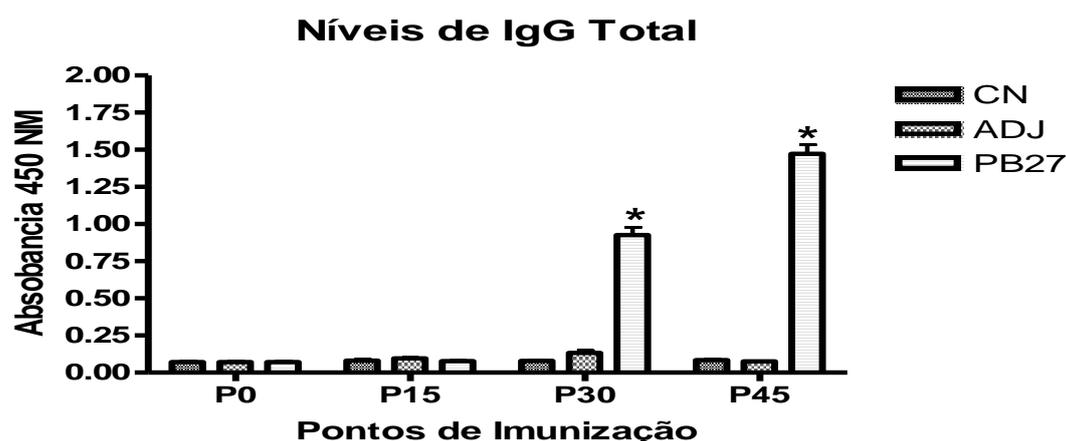


Figura 1. Detecção dos níveis de anticorpos IgG anti Pb27r, em camundongos BALB/c durante o período de imunização. Soros de camundongos foram utilizados em ensaios de ELISA na diluição de 1:200 para detecção de anticorpos IgG anti Pb27r. Em cada ponto está representado a média e o desvio padrão do soro de três animais de cada grupo. Para o ensaio foram utilizados 0,5 µg de Pb27r por poço. Os grupos representados na figura são: Controle negativo (CN); adjuvante (ADJ) e imunizado (PB27). *diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos.

Níveis de subtipos de IgG durante as Imunizações

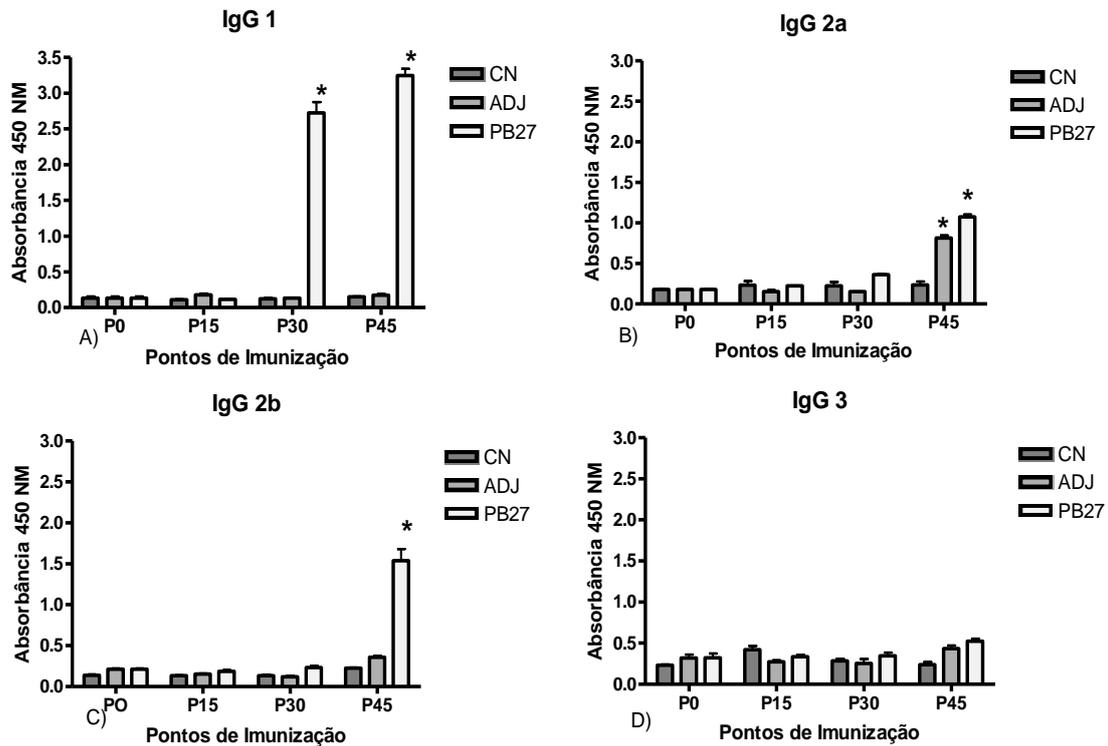


Figura 2. Detecção dos níveis dos subtipos de IgG anti-Pb27r, em camundongos durante os períodos de imunização. Soros de camundongos foram utilizados em ensaios de ELISA na diluição de 1:200 para detecção dos subtipos de IgG anti Pb27r. Em cada ponto está representado a média e o desvio padrão do soro de três animais de cada grupo. Para o ensaio foi utilizado 0,5 µg por poço da Pb27r. Os grupos representados na figura são: Controle negativo (CN); adjuvante (ADJ) e imunizado (PB27). * diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos.

A coleta do soro também foi efetuada nos pontos de eutanásia e os níveis de IgG total foram determinados através do ensaio de ELISA. Níveis significativos de anticorpos IgG anti Pb27r foram detectados 30 e 90 dias após a infecção (1PTM e 2PTM), nos animais imunizados (PB27) e também em animais imunizados e tratados (PB27 +TRAT). Os outros grupos infectados com *P. brasiliensis* não apresentaram níveis significativos de anticorpos contra essas proteínas, assim como os animais que não sofreram intervenções (Figura 3).

Como a imunização com a proteína Pb27r também induziu a produção de altos níveis de IgG após os pontos de eutanásia, foram realizados ensaios de ELISA para determinar quais subclasses de IgG foram predominantes após a infecção. O resultado encontra-se representado na Figura 4. Níveis significativos de anticorpos específicos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti Pb27r

foram detectados nos soros de camundongos imunizados (PB27) em relação aos camundongos de grupos controles (CN, CP e ADJ) no primeiro ponto de morte (30 dias após a infecção desafio), sendo que, IgG 2a foi o subtipo que teve menores níveis de produção em relação aos demais subtipos de IgG (Figura 4. A, B, C e D).

No segundo ponto de morte os níveis de IgG1 foram significativamente maiores em animais imunizados (PB27) e imunizados e tratados (PB27 + TRAT), (Figura 4A). Já os níveis de IgG2a foram significativamente maiores nos grupos controle negativo (CN), adjuvante (ADJ) e imunizados (PB27) em relação ao controle positivo, os camundongos imunizados e tratados (PB27+TRAT) e somente tratado (TRAT) não tiveram diferenças estatísticas em relação aos demais grupos no segundo ponto de morte (Figura 4B). Os níveis de IgG2b foram significativamente maiores nos grupos controle negativo (CN), adjuvante (ADJ), imunizados tratados ou não com Fluconazol (PB27 e PB27 + TRAT) em relação aos camundongos dos grupos controle positivo (CP) e somente tratado (TRAT) no segundo Ponto de Morte (Figura 4C). Os níveis de IgG 3 não tiveram diferença significativa entre os grupos no segundo Ponto de Morte (Figura 4D).

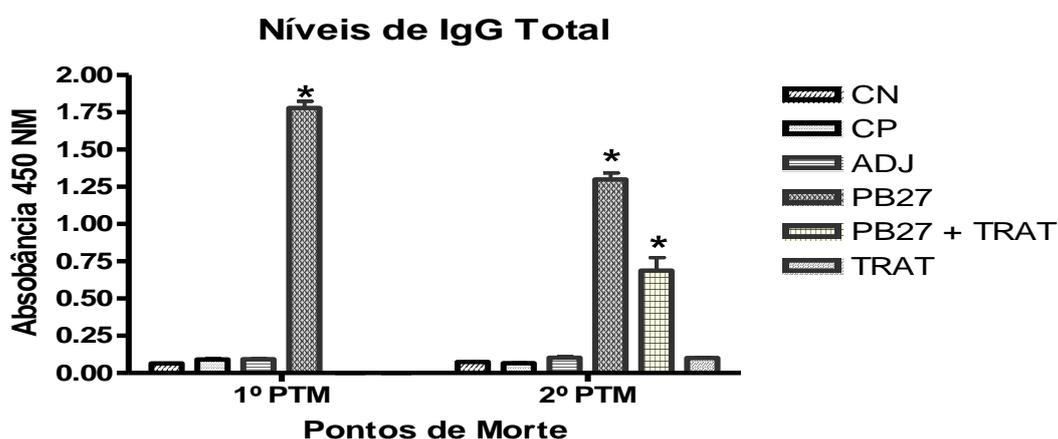


Figura 3. Detecção dos níveis de anticorpos IgG total anti Pb27r após a infecção desafio por *P. brasiliensis*. Soros de camundongos foram utilizados em ensaios de ELISA na diluição de 1:200 para detecção de anticorpos IgG anti Pb27r . Cada ponto representa a média e o desvio padrão do soro de três animais de cada grupo. Para o ensaio foi utilizado 0,5 µg da Pb27r por poço. Os grupos representados são: Controle negativo (CN). Controle positivo (CP). adjuvante (ADJ). tratado (TRAT). imunizado (PB27). imunizado/tratado (PB27+TRAT.).* diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos.

Níveis de subtipos de IgG após infecção desafio

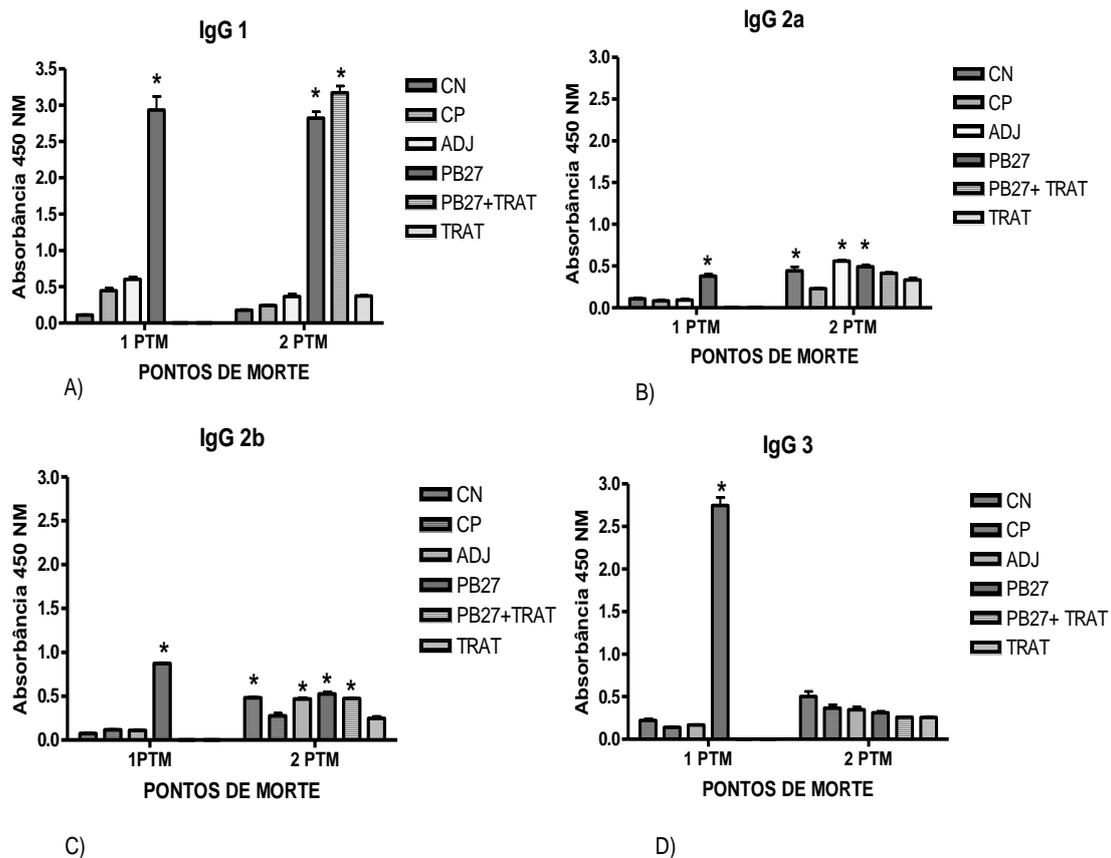


FIGURA 4. Detecção dos níveis dos subtipos de IgG antiPb27r, em camundongos após infecção desafio. Soros de camundongos foram utilizados em ensaios de ELISA na diluição de 1:200 para detecção dos subtipos de IgG anti Pb27r. Cada ponto representa a média e o desvio padrão do soro de três animais de cada grupo. Para o ensaio foi utilizado 0,5 µg da Pb27r por poço. Os grupos representados na figura são: Controle negativo (CN) controle positivo (CP). adjuvante (ADJ). tratado (TRAT) imunizado (PB27). imunizado/tratado (PB27+TRAT). *diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle positivo .

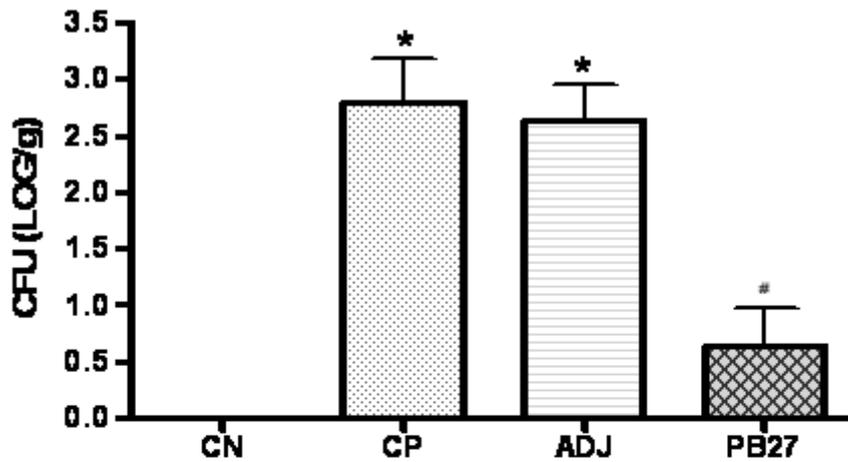
5.2. DETERMINAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFCs)

Para avaliar o efeito protetor da proteína Pb27r, a imunização iniciou-se 45 dias antes da infecção desafio e foi efetuada uma vez a cada 15 dias. O tratamento com o quimioterápico Fluconazol iniciou-se 30 dias após a infecção desafio e foi efetuado durante 30 dias consecutivos. As análises de UFCs foram realizadas 30 e 90 dias após a infecção com *P. brasiliensis*. Para tanto, os pulmões foram coletados, macerados e plaqueados em meio BHI-ágar. Os dados obtidos foram plotados e expressos em Log_{10} da média de UFCs por grama de tecido (Figura 5).

É possível observar a partir da análise da Figura 5, que após 30 dias de infecção, os grupos CP e ADJ apresentaram valores significativamente maiores de unidades formadoras de colônias em relação ao controle negativo, enquanto, no grupo imunizado (PB27) quando comparado ao controle negativo (CN) não foi possível observar diferença significativa. Ainda, o grupo imunizado (PB27) apresentou uma redução significativa no número de UFCs por grama de tecido no pulmão em relação aos demais grupos infectados, sendo essa redução de 78% quando comparado ao grupo Controle positivo (CP) e de 75% quando comparado ao adjuvante (ADJ), (Figura 5A).

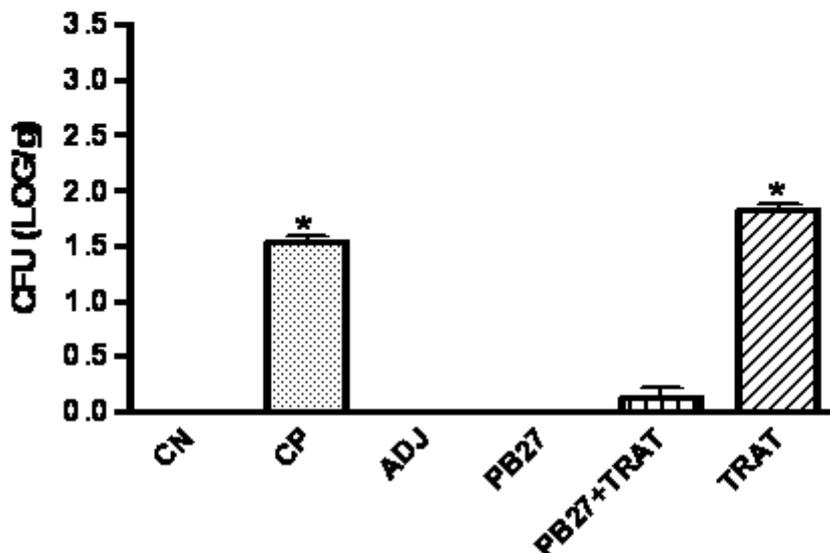
Após 90 dias de infecção, os grupos: adjuvante (ADJ), imunizado (PB27) e imunizado e tratado (PB27 + TRAT) apresentaram redução significativa no número de UFCs por grama de tecido pulmonar, quando comparados aos grupos controle positivo (CP) e tratado (TRAT) que tiveram níveis significativamente maiores de UFCs. Sendo que os grupos adjuvante (ADJ), imunizado (PB27) não apresentaram números detectáveis de UFC no pulmão e o grupo imunizado e tratado (PB27 + TRAT) apresentou uma redução de 90% em relação aos grupos Controle positivo (CP) e somente tratado (TRAT), (Figura 5B).

Unidades Formadoras de Colônias



A) 1ª PTM - 30 dias após infecção desafio.

Unidades Formadoras de Colônias



B) 2ª PTM - 90 dias após infecção desafio.

Figura 5: Ensaio de proteção em PCM experimental.

Detecção de unidades formadoras de colônias (expresso em Log₁₀) em pulmões, de camundongos infectados por via intratraqueal com 3×10^5 células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18), e analisados após 30 (A) e 90 (B) dias de infecção. Cada barra representa a média e o desvio padrão de pulmões de 3 animais em cada grupo. *diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo # diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação ao Controle positivo e adjuvante. Os grupos representados na figura são: Controle negativo (CN) controle positivo (CP). adjuvante (ADJ). tratado (TRAT) imunizado (PB27). imunizado/tratado (PB27+TRAT.).

5.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os pulmões dos animais foram removidos, fixados, inclusos e corados para análise histológica, morfométrica e visualização de células fúngicas nos animais acometidos. Todas as análises de infiltrados inflamatórios são relativas ao controle negativo e as intensidades não são quantitativas, expressam de forma qualitativa os níveis de infiltrado.

A coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) foi utilizada para avaliação do processo inflamatório e formação de granulomas, e através desta coloração foi possível visualizar nos pulmões dos animais Infectados (CP) , após 30 dias de infecção, a presença de granulomas multifocais, de intensidades entre discreto e moderado, constituídos por infiltrados inflamatórios intersticiais formados por linfócitos, histiócitos e células gigantes do tipo corpo estranho, associadas a estruturas celulares birrefringentes circulares, variando entre 6 e 20 µm de diâmetro, compatíveis com células leveduriformes de *P. brasiliensis*, com localização intralesional (Figura 6B). O grupo adjuvante (ADJ) apresentou infiltrado inflamatório bronco-intersticial, multifocal intenso, constituído por linfócitos, histiócitos, plasmócitos e neutrófilos (Figura 6C)

Entretanto, animais imunizados (PB27), não apresentaram lesão digna de nota, apenas um infiltrado inflamatório intersticial perivascular leve, constituído por linfócitos e histiócitos (Figura 6D).

Após 90 dias de infecção, os pulmões dos animais infectados (CP) apresentaram granulomas multifocais em intensa quantidade, constituídos por infiltrados inflamatórios associados aos brônquios, formado por linfócitos, histiócitos e células gigantes do tipo corpo estranho associadas a estruturas celulares compatíveis com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Figura 7B). O grupo adjuvante (ADJ) apresentou infiltrado inflamatório bronco intersticial, difuso, intenso, não granulomatoso, com resposta predominantemente neutrofílica, linfo-histiocitária e plasmocitária em discreta quantidade (Figura 7C).

Os pulmões dos animais tratados (TRAT) apresentaram granulomas, multifocais de intensidades entre discreto e moderado, constituídos por

infiltrados inflamatórios intersticiais formados por linfócitos e histiócitos, com presença de células gigantes associadas células fúngicas (Figura7D). Animais que foram imunizados e tratados (Pb27+TRAT) apresentaram pulmões com infiltrado inflamatório intersticial perivascular, multifocal discreto, não granulomatoso, formado por linfócitos e histiócitos (Figura7E). No entanto, animais que foram imunizados (PB27), apresentaram apenas aumento de celularidade, com infiltrado intersticial perivascular leve, mas com vias aéreas desobstruídas e sem lesão digna de nota (Figura7F).

As lâminas referentes aos pulmões dos grupos experimentais também foram submetidas à coloração por Grocott, com intuito de evidenciar a presença de células fúngicas. Os resultados obtidos confirmaram os resultados já observados na coloração de HE e na determinação de UFCs, quanto à presença de células fúngicas. Nestes experimentos, evidenciou-se que após 30 dias de infecção, entre os grupos infectados por *P. brasiliensis* o grupo imunizado (Pb27) apresentou redução significativa no número de UFCs por grama de tecido em relação aos demais grupos infectados. Sendo essa redução de 78% quando comparado ao grupo Controle positivo (CP) e de 75% quando comparado ao adjuvante (ADJ), (Figura 8).

Após 90 dias de infecção, os grupos: controle positivo (CP) e tratado (TRAT) tiveram níveis significativamente maiores de UFCs. Sendo que os grupos adjuvante (ADJ) e imunizado (PB27) não apresentaram números detectáveis de UFC no pulmão. O grupo imunizado e tratado (PB27 + TRAT) apresentou uma redução e 90% em relação aos grupos Controle positivo (CP) e somente tratado (TRAT) (Figura 9).

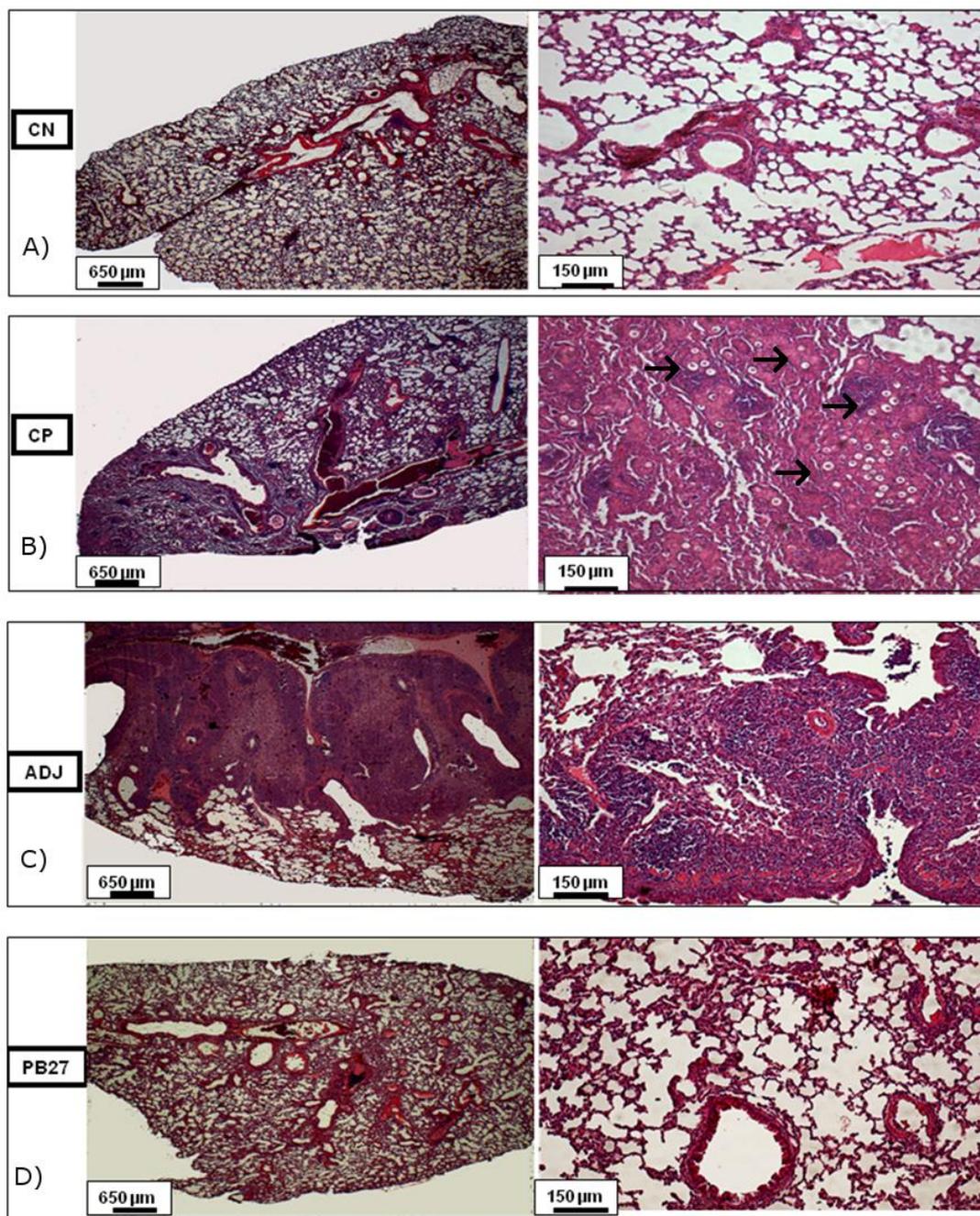


Figura 6. Análise histológica e morfométrica dos pulmões de camundongos submetidos à infecção por *P. brasiliensis* e removidos 30 dias após a infecção desafio. Após 30 dias de infecção por *P. brasiliensis* os pulmões foram removidos, fixados, inclusos, corados e analisados por Histologia, na coloração de HE. À esquerda pulmões representados em menor aumento (4x) e à direita em maior aumento (10x). Grupos (CN) controle negativo (Painel A), (CP) controle positivo (Painel B), (ADJ) adjuvante (Painel C) e (PB27) imunizado (Painel D). As setas pretas indicam a localização das células fúngicas no tecido.

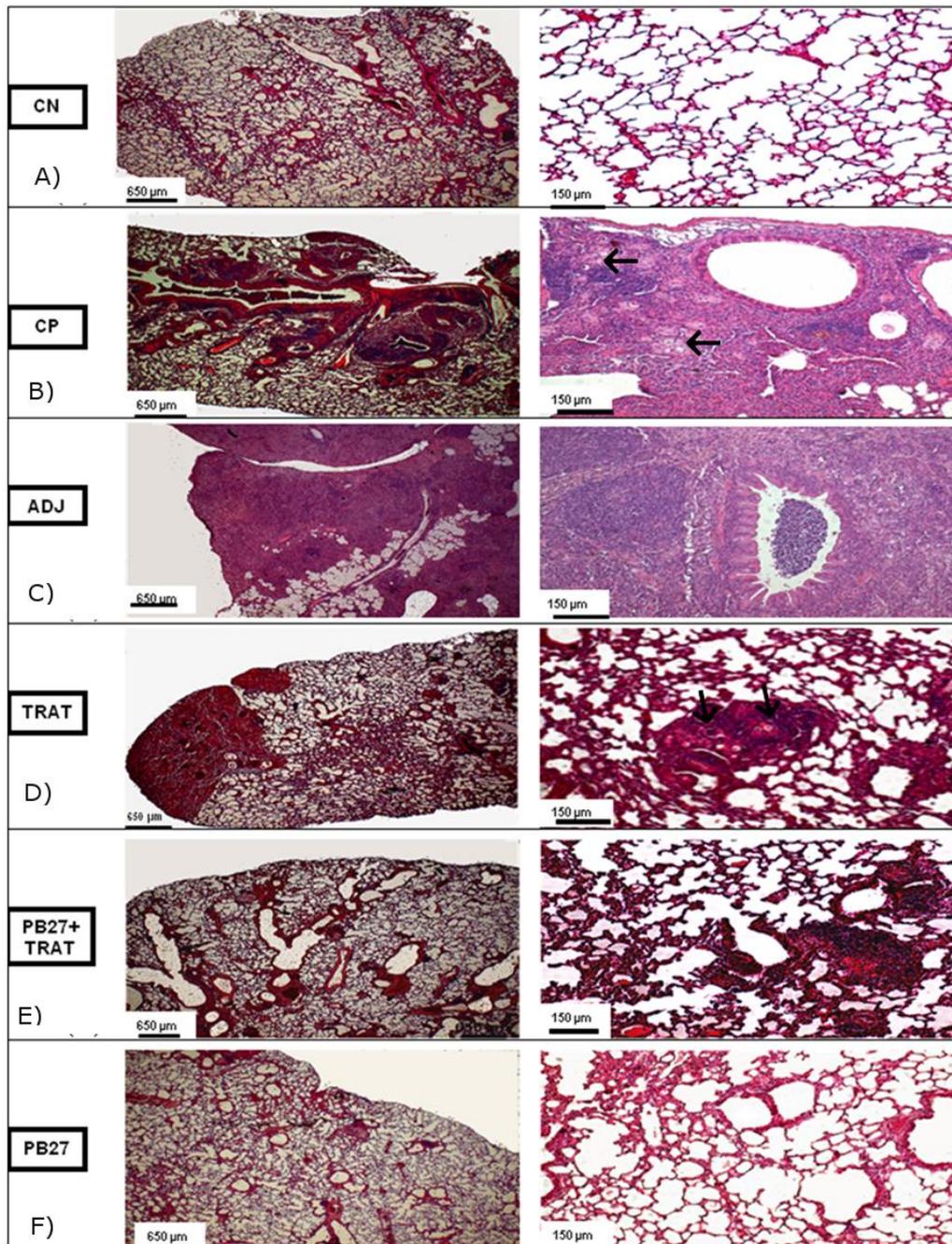


Figura 7. Análise histológica e morfométrica dos pulmões de camundongos submetidos à infecção por *P. brasiliensis* e removidos 90 dias após a infecção desafio. Após 90 dias de infecção por *P. brasiliensis*, os pulmões foram removidos, fixados, inclusos, corados e analisados por Histologia, na coloração de HE. À esquerda pulmões representados em menor aumento (4x) e à direita em maior aumento (10x). Grupos (CN) controle negativo (Painel A), (CP) controle positivo (Painel B), (ADJ) adjuvante (Painel C), (TRAT) tratado (Painel D), (TRAT+ PB27) imunizado e tratado (Painel E), (PB27) imunizado (Painel F). As setas pretas indicam a localização das células fúngicas no tecido.

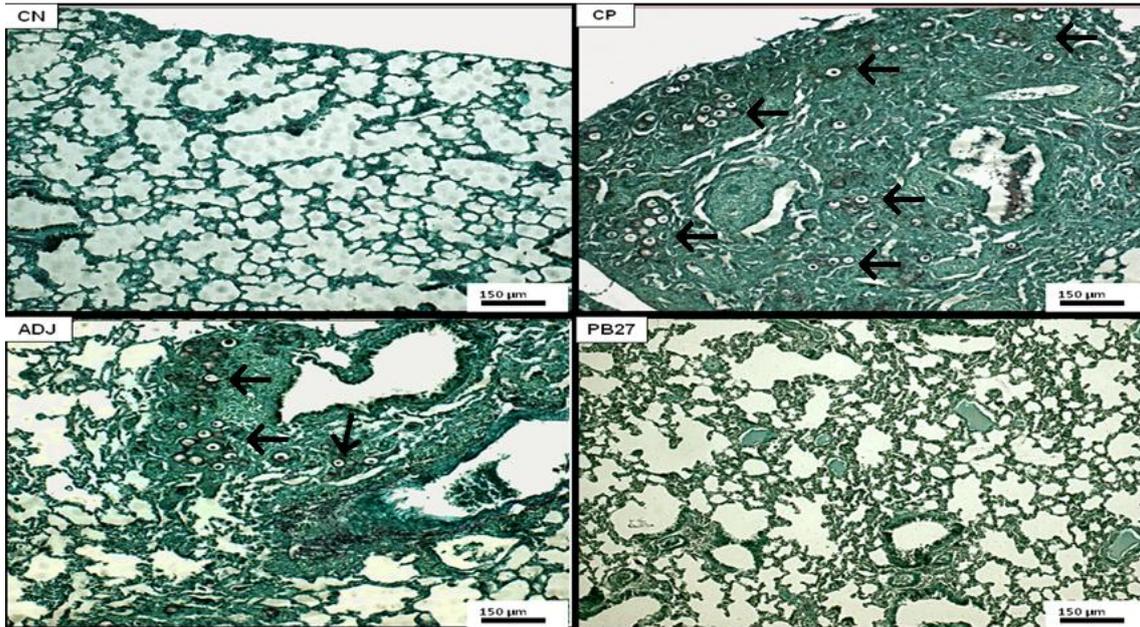


Figura 8. Microscopia de pulmão camundongo corado por Grocott, 30 dias após infecção desafio com *P. brasiliensis*. Após 30 dias de infecção por *P. brasiliensis* os pulmões foram removidos, fixados, inclusos, corados e analisados, na coloração de Grocott com o intuito de evidenciar a presença de células fúngicas. Microscopia de pulmão, lente objetiva de aumento 10x. Grupos (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante e (PB27) imunizado. As setas pretas indicam a localização das células fúngicas no tecido.

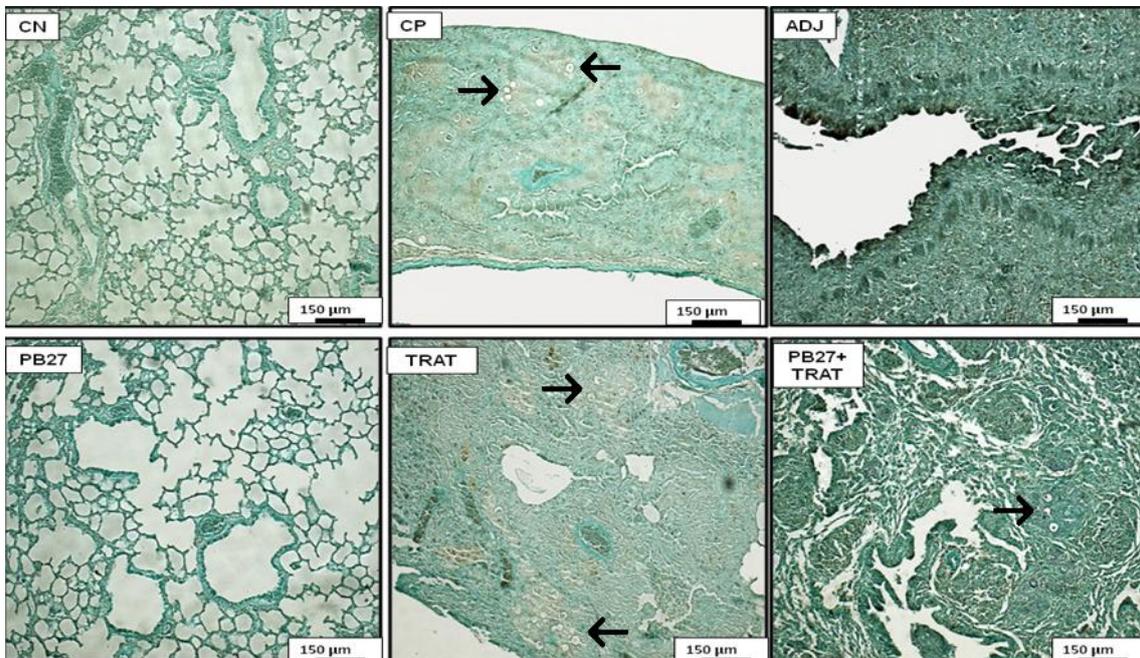


Figura 9. Microscopia de pulmão de camundongo corado por Grocott, 90 dias após infecção desafio com *P. brasiliensis*. Após 90 dias de infecção por *P. brasiliensis* os pulmões foram removidos, fixados, inclusos, corados e analisados, na coloração de Grocott evidenciar a presença de células fúngicas. Microscopia de pulmão, lente objetiva de aumento 10x. Grupos (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante e (PB27) imunizado. As setas pretas indicam a localização das células fúngicas no tecido.

Além disso, cortes histológicos dos pulmões dos grupos experimentais, também foram coradas com Tricrômico de Masson, técnica que possibilitou evidenciar áreas com presença de fibras colágenas, bem como, a avaliação qualitativa das regiões de fibrose.

A análise das lâminas coradas com Tricrômico de Masson mostrou que, após 30 dias de infecção por *P. brasiliensis* (1º PTM), os grupos controle positivo (CP) e adjuvante (ADJ) apresentaram regiões granulomatosas e células fúngicas parcial ou totalmente circundadas e entremeadas por tecido conjuntivo fibroso, além disso, foi possível detectar a presença de fibras colágenas entremeadas no interstício (Figura 10B e C). Animais imunizados (PB27), quando comparados aos demais grupos infectados (CP e ADJ), tiveram uma diminuição nas regiões com presença de fibras de colágeno, sendo estas, em sua maioria, entremeadas no interstício (Figura 10D). Entre os grupos, o adjuvante foi o grupo mais acometido por fibrose (Figura 10).

Após 90 dias de infecção por *P. brasiliensis* (2º PTM), a análise histológica mostrou que o grupo controle positivo (CP) e (ADJ) mantiveram granulomas e células fúngicas parcial ou totalmente circundadas e entremeadas por tecido conjuntivo fibroso, havendo um aumento de áreas acometidas no ponto de 90 dias (Figura 11B e C). O grupo tratado (TRAT) apresentou granulomas e células fúngicas totalmente circundadas e entremeadas por tecido conjuntivo fibroso, este grupo comparado com os demais grupos infectados, foi o que apresentou maior área do pulmão acometida fibrose (Figura 11D). Animais imunizados e tratados (PB27+TRAT) apresentaram infiltrados inflamatórios parcialmente delimitados e entremeados por tecido conjuntivo fibroso, porém, em menor quantidade que o grupo somente tratado, mas em vários pontos do interstício pôde-se observar a presença de fibrose (Figura 11E). Contudo, em animais somente imunizados (PB27), foi possível detectar poucas regiões coradas pelo Tricrômico de Masson, sendo que, estas estavam parcialmente entremeadas em áreas de infiltrado inflamatório, no interstício e em alguns casos, associadas ao endotélio em quantidade superior ao normal (Figura 11F).

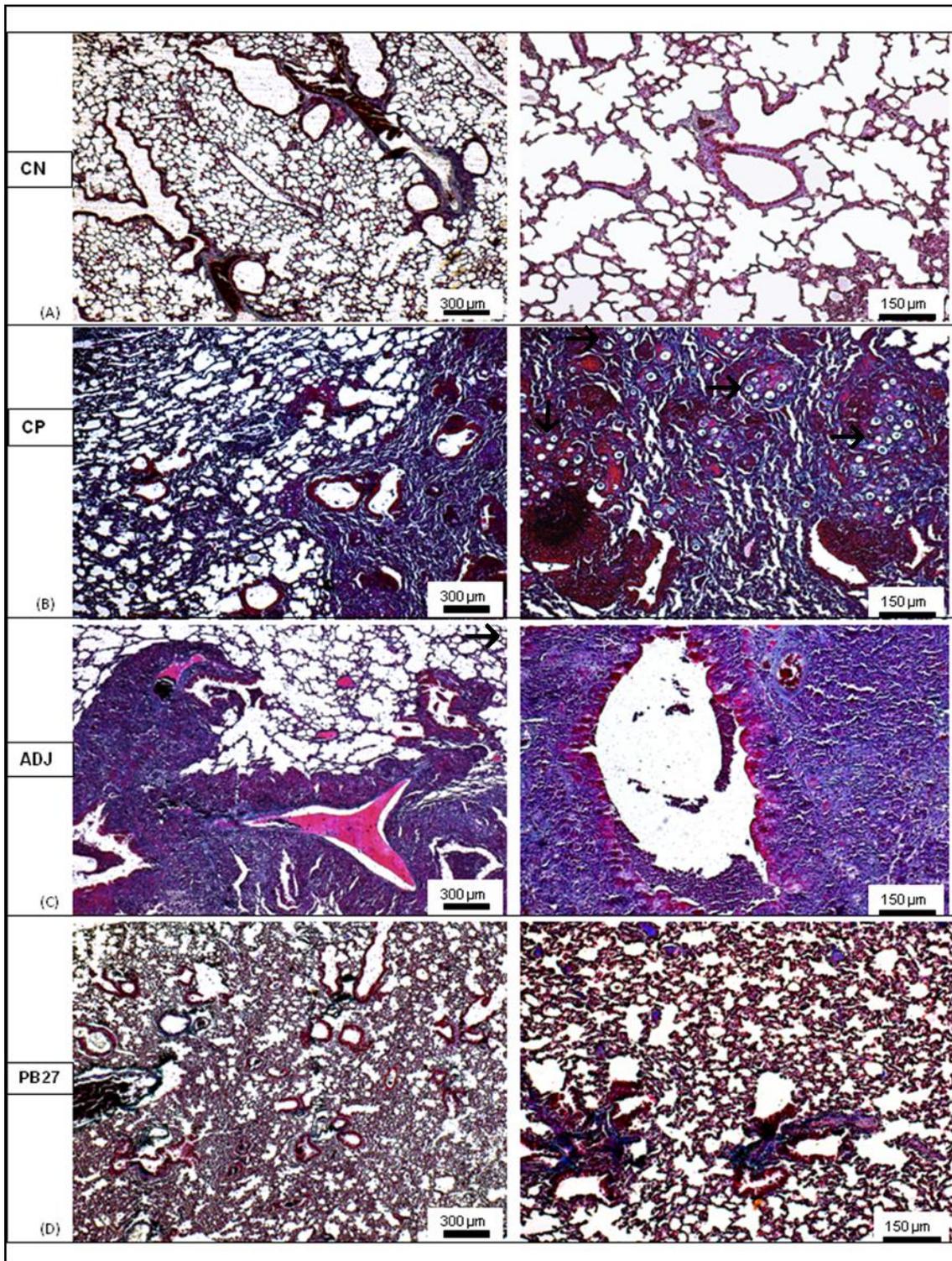


Figura 10. Microscopia de pulmão de camundongo, corados por Tricrômico de Masson 30 dias após infecção desafio com *P. brasiliensis*. Após 30 dias de infecção por *P. brasiliensis* os pulmões foram removidos, fixados, inclusos, corados e analisados, na coloração de Tricrômico de Masson, com o intuito de evidenciar a presença fibras colágenas do tipo I, bem como, formação de fibrose. Microscopia de pulmão, imagens à esquerda lente objetiva de aumento de 4x e à direita lente objetiva de aumento de 10x. Grupos: (CN) controle negativo. (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante e (PB27) imunizado. As setas pretas indicam a localização das células fúngicas no tecido.

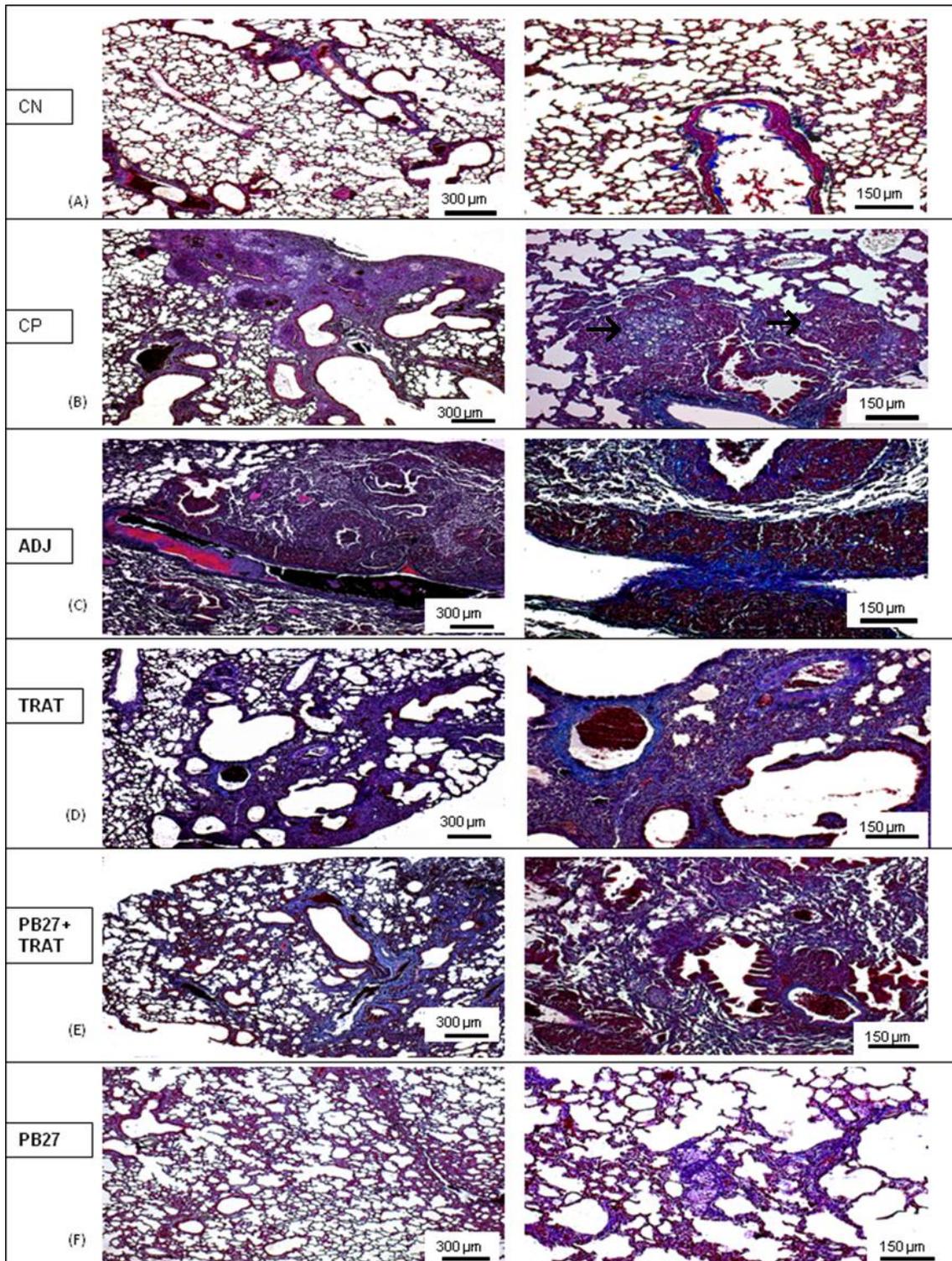


Figura 11. Microscopia de pulmão de camundongo, corados por Tricrômico de Masson 90 dias após infecção desafio com *P. brasiliensis*. Após 90 dias de infecção por *P. brasiliensis* os pulmões foram removidos, fixados, inclusos, corados e analisados, na coloração de Tricrômico de Masson, com o intuito de evidenciar a presença fibras colágenas tipo do I, bem como, formação de fibrose. Microscopia de pulmão, imagens à esquerda foi utilizada lente objetiva de aumento de 4x e à direita lente objetiva de aumento de 10x. Grupos: (CN) controle negativo (FIG.11 A), (CP) controle positivo (FIG 11B), (ADJ) adjuvante (FIG.11C), (TRAT) tratado (FIG. 11D), (TRAT+ PB27) imunizado e tratado (FIG 11E), (PB27) imunizado (FIG 11F). As setas pretas indicam a localização das células fúngicas no tecido.

5.4. IMUNOHISTOQUÍMICA

A técnica de imunohistoquímica (IHQ) foi utilizada com o intuito de detectar moléculas (antígenos) teciduais. Foi utilizada a técnica de IHQ indireta parcialmente modificada e padronizada. O reconhecimento do antígeno foi feito por um anticorpo (Ac primário) específico e um anticorpo secundário (anti IgG da espécie animal na qual o anticorpo primário foi produzido) associado (conjugado) à Peroxidase. As marcações que detectam a expressão do antígeno desejado aparecem na cor castanha devido à interação: Peroxidase – diaminobenzidina (DAB).

A Imunohistoquímica foi utilizada para a análise qualitativa com a finalidade de avaliar os sinais de sobrevivência celular endotelial, pela expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um importante regulador do desenvolvimento e manutenção vascular. A análise dos cortes histológicos permitiu inferir que, 30 dias após a infecção por *P. brasiliensis*, os grupos controle positivo (CP) e adjuvante (ADJ) tiveram menor expressão de VEGF, quando comparados aos grupos controle negativo (CN) e imunizado (PB27) (Figura 12). Após 90 dias de infecção por *P. brasiliensis*, foi possível observar que os grupos controle positivo (CP) e adjuvante (ADJ), tiveram menor marcação de moléculas de VEGF no pulmão em comparação aos demais grupos. Além disso, é possível observar que os grupos controle negativo (CN), imunizado (PB27) e imunizado e tratado (PB27+ TRAT) apresentaram pulmões com mais regiões marcadas pela expressão de VEGF do que os demais grupos (Figura 13).

A técnica de imunohistoquímica também foi utilizada com a finalidade de determinar os níveis de morte celular a partir da detecção da enzima Caspase 3 ativa. A análise dos resultados permitiu identificar que 30 dias após a infecção desafio, o grupo imunizado (PB27) quando comparado com os outros grupos, foi o grupo que obteve maior reatividade e maiores áreas marcadas para a presença de Caspase 3 ativa, sendo o adjuvante (ADJ) o grupo em que menos foram detectadas áreas marcadas para a presença de Caspase 3 ativa (Figura 14). Não obstante, 90 dias após a infecção desafio, pôde-se observar ao analisar os cortes histológicos, que o grupo adjuvante, quando comparado

com os demais grupos, permaneceu sendo o grupo em que menos se detectou Caspase 3 ativa, enquanto, nos grupos imunizados e tratados (PB27, PB27+ TRAT e TRAT), foi possível constatar altos níveis desta enzima através da marcação imunohistoquímica, novamente neste ponto de morte, o grupo imunizado (PB27) apresentou maiores regiões do pulmão marcadas para a presença da enzima caspase 3 ativa (Figura 15).

Com o intuito de detectar e imunolocalizar receptores de quimiocina CCR7, também foi utilizada a marcação Imunohistoquímica. A análise dos cortes histológicos permitiu observar que, 30 dias após a infecção por *P. brasiliensis*, os grupos adjuvante (ADJ) e controle positivo (CP) apresentaram maiores níveis do receptor de quimiocina, que predominantemente apresentaram localização intersticial, principalmente entremeados nos infiltrados inflamatórios, enquanto nos grupos imunizado (PB27) e controle negativo (CN), estas células estavam localizadas principalmente associadas ao endotélio. O grupo adjuvante, teve maiores áreas marcadas para a presença do receptor de quimiocina CCR7.

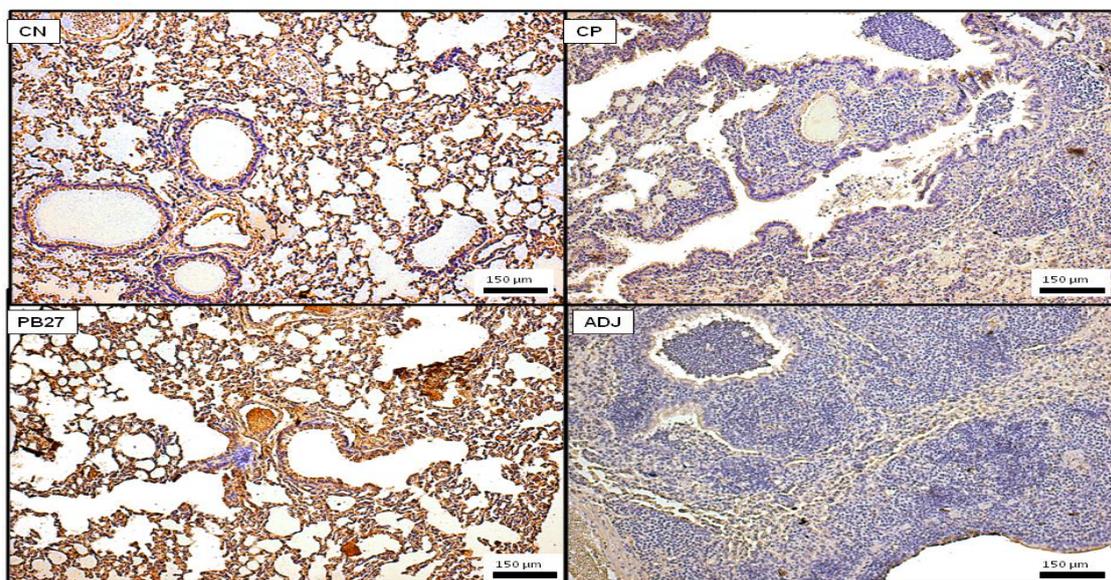


Figura 12. Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 30 dias após infecção desafio por *P. brasiliensis* demonstrando a imunolocalização do VEGF. Após 30 dias de infecção por *P. brasiliensis*, foi efetuada a técnica de Imunohistoquímica com o intuito avaliar qualitativamente a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Microscopia de pulmão, lente objetiva de aumento de 10x. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante, (PB27) imunizado.

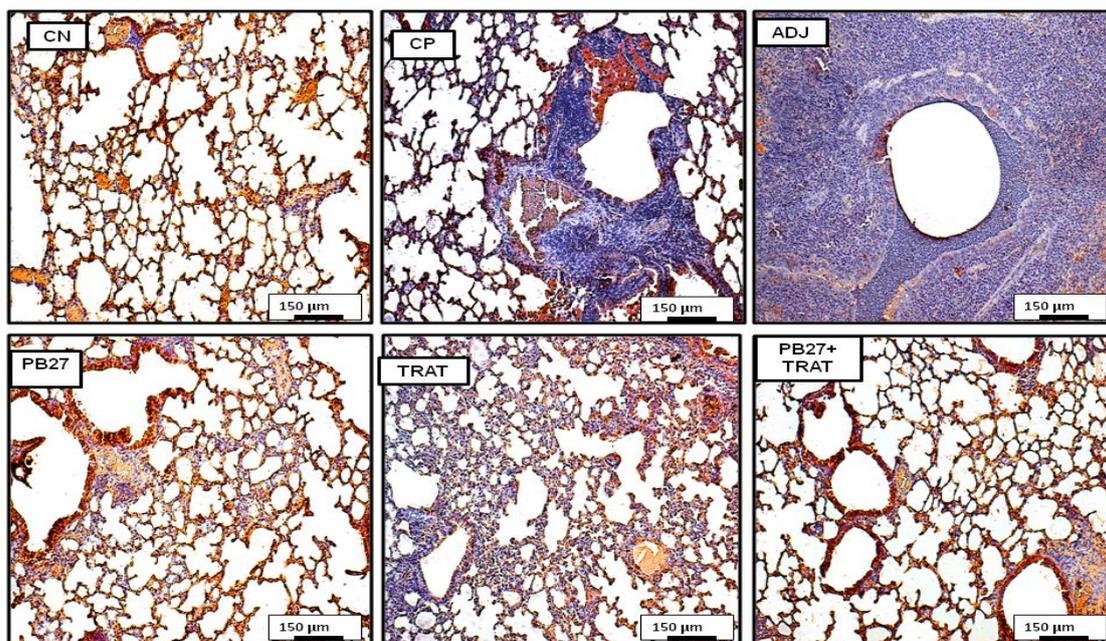


Figura 13. Microscopia de pulmão de camundongo marcado pela técnica de Imunohistoquímica, 90 dias após infecção desafio por *P. brasiliensis* demonstrando a imunolocalização do VEGF. Após 90 dias de infecção por *P. brasiliensis*, foi efetuada a técnica de Imunohistoquímica com o intuito avaliar qualitativamente a expressão do Fator De Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). Lente objetiva de aumento de 10x. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante, (TRAT) tratado, (TRAT+PB27) imunizado e tratado e (PB27) imunizado.

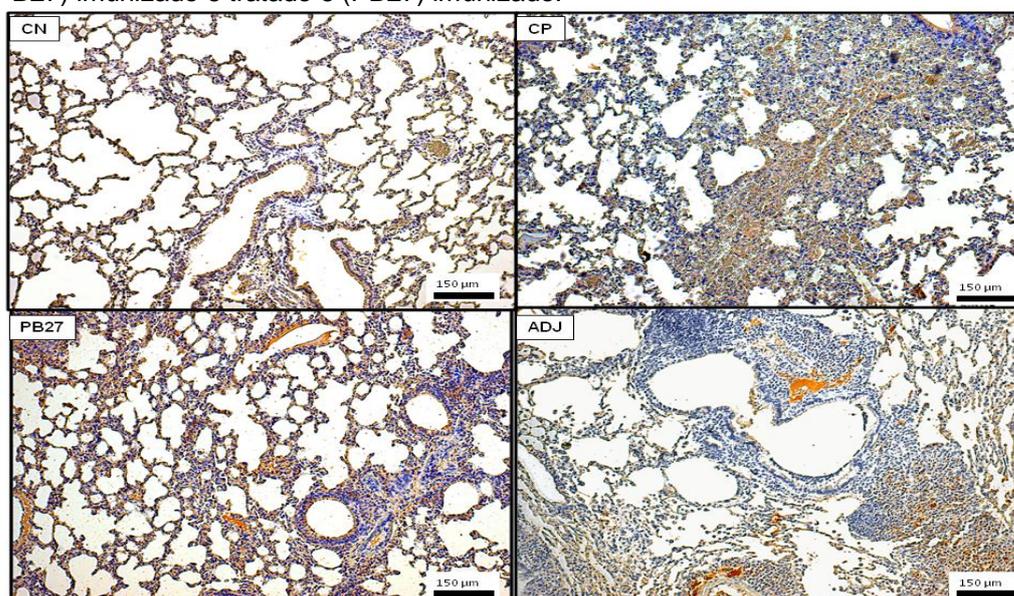


Figura 14. Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 30 dias após infecção desafio por *P. brasiliensis* demonstrando a imunolocalização da enzima Caspase 3 ativa. Após 30 dias de infecção por *P. brasiliensis*, foi efetuada a técnica de Imunohistoquímica com o intuito de detectar os níveis de morte celular a partir da marcação da enzima Caspase 3 ativa. Microscopia de pulmão utilizando lente objetiva de aumento de 10x. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante e (PB27) imunizado.

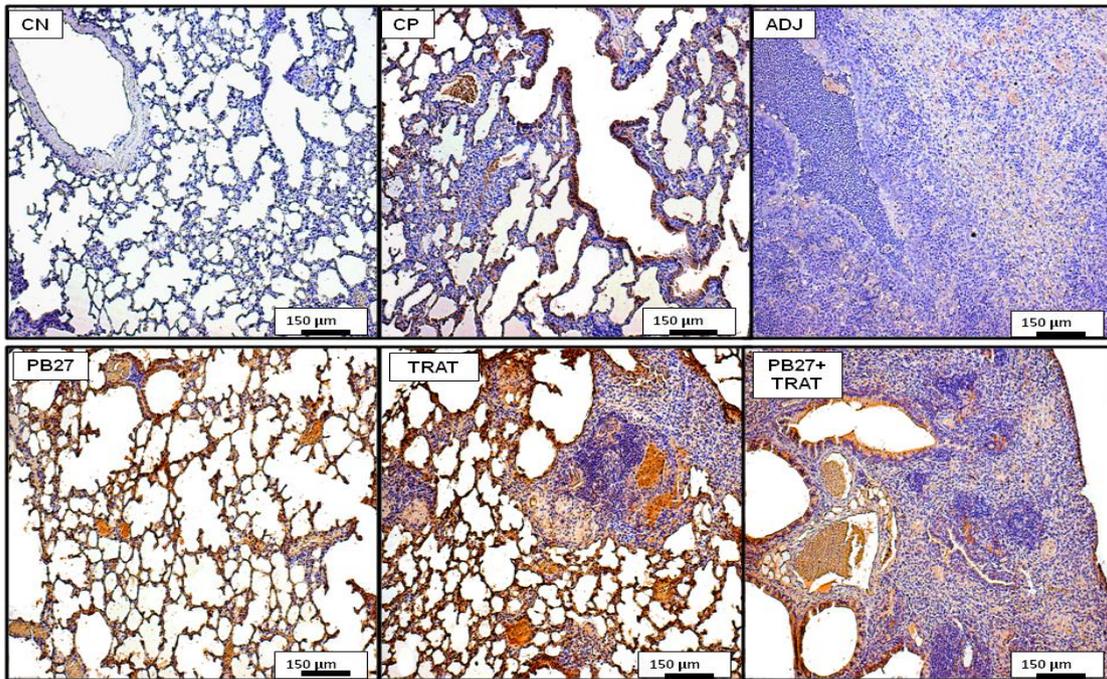


Figura 15. Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 90 dias após infecção desafio por *P. brasiliensis* demonstrando a imunolocalização da enzima Caspase 3 ativa. Após 90 dias de infecção por *P. brasiliensis*, foi efetuada a técnica de Imunohistoquímica com o intuito de detectar os níveis de morte celular a partir da marcação da enzima Caspase 3 ativa. Lente objetiva de aumento de 10x. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante e (PB27) imunizado, (PB27+ TRAT) imunizado e tratado e (TRAT) tratado.

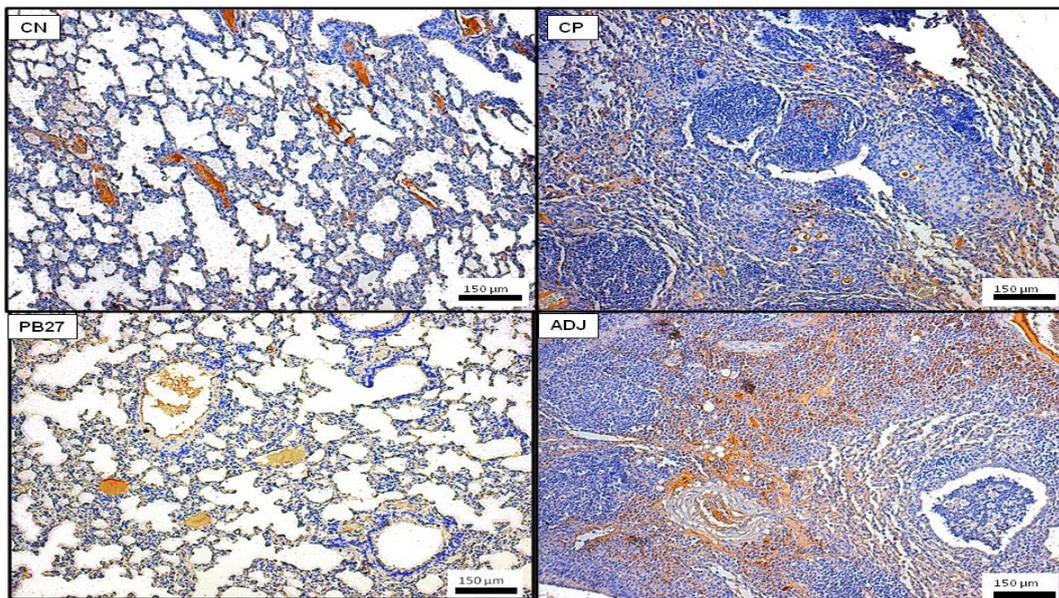


Figura 16. Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 30 dias após infecção desafio por *P. brasiliensis* demonstrando a imunolocalização do receptor de quimiocina CCR7. Após 30 dias de infecção por *P. brasiliensis*, foi efetuada a técnica de Imunohistoquímica para detectar e imunolocalizar células Dendríticas e linfócitos pela marcação do receptor de quimiocina CCR7. Imagens obtidas utilizando lente objetiva de aumento de 10x. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante e (PB27) imunizado.

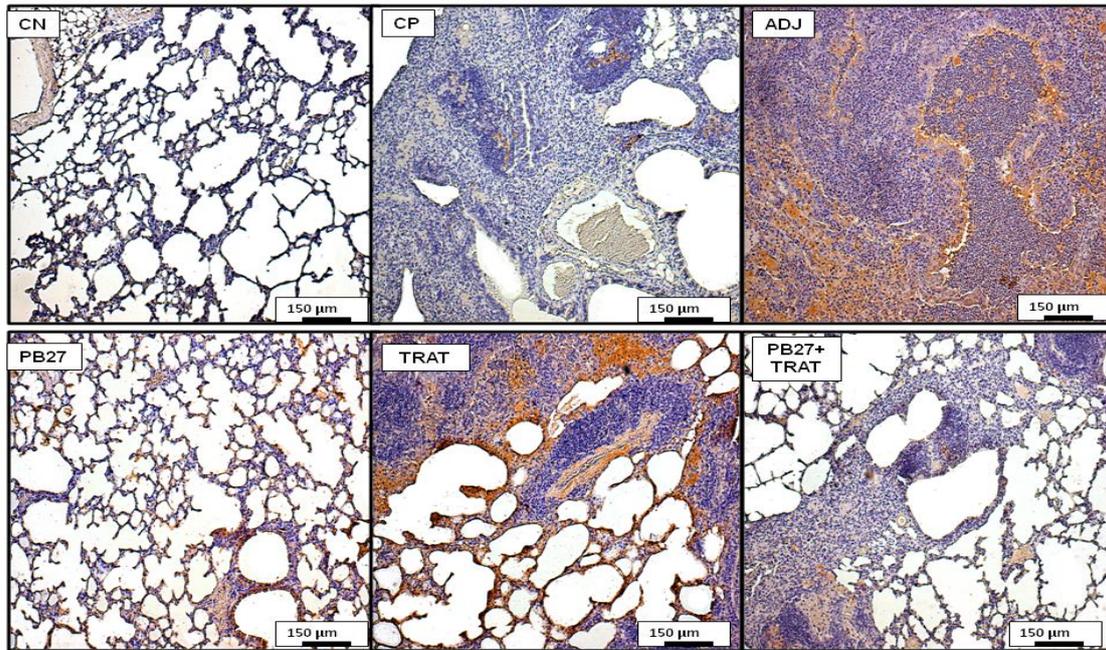


Figura 17. Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de Imunohistoquímica 90 dias após infecção desafio demonstrando a imunolocalização do receptor de quimiocina CCR7. Após 90 dias de infecção por *P. brasiliensis*, foi efetuada a técnica de Imunohistoquímica para detectar e imunolocalizar o **receptor de quimiocina CCR7**. Imagens obtidas utilizando lente objetiva de aumento de 10x. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante, (PB27) imunizado, (PB27+TRAT) imunizado e tratado e (TRAT) tratado.

Não obstante, 90 dias após a infecção desafio, é possível observar que os grupos adjuvante e tratado apresentaram maiores áreas marcadas para a presença do receptor de quimiocina CCR7, sendo estas marcações entremeadas ao infiltrado inflamatório e associadas ao endotélio. Em específico, no grupo adjuvante, é possível observar marcações para o CCR7 associadas aos brônquios e intrabronquiais. Nos demais grupos a marcação imunohistoquímica para a presença de células dendríticas apareceu em menor quantidade, porém, em localização parecida.

Ainda, a imunohistoquímica foi utilizada para avaliar a expressão do receptor do tipo **Toll** (TLR4) nos pulmões dos animais. A análise dos cortes histológicos permitiu identificar que, 30 dias após a infecção desafio, todos os grupos de animais que foram infectados por *P. brasiliensis* (CP, ADJ, PB27), tiveram um aumento na expressão deste receptor se comparados com o grupo não infectado. Além disso, os animais imunizados (PB27) apresentaram maior marcação imunohistoquímica para este receptor quando comparados com os

demais grupos (Figura 18). Após 90 dias da infecção desafio, pôde-se observar que os grupos adjuvante e tratado obtiveram maior marcação para o receptor Toll 4 em relação aos demais grupos experimentais (Figura 19).

Por fim, foram mensurados também, os níveis do estabelecidos os níveis do receptor de VEGF, **VEGFR-2** (KDR/Flk-1), que, 30 dias após a infecção por *P. brasiliensis*, obteve pouca marcação em todos os grupos, sendo os grupos controle negativo e imunizado, os grupos que tiveram mais áreas marcadas (Figura 21). Apesar disso, 90 dias após a infecção desafio, os grupos imunizados (PB27 e PB27+ TRAT), mostraram maiores marcações para este receptor e em várias áreas do pulmão (Figura 22).

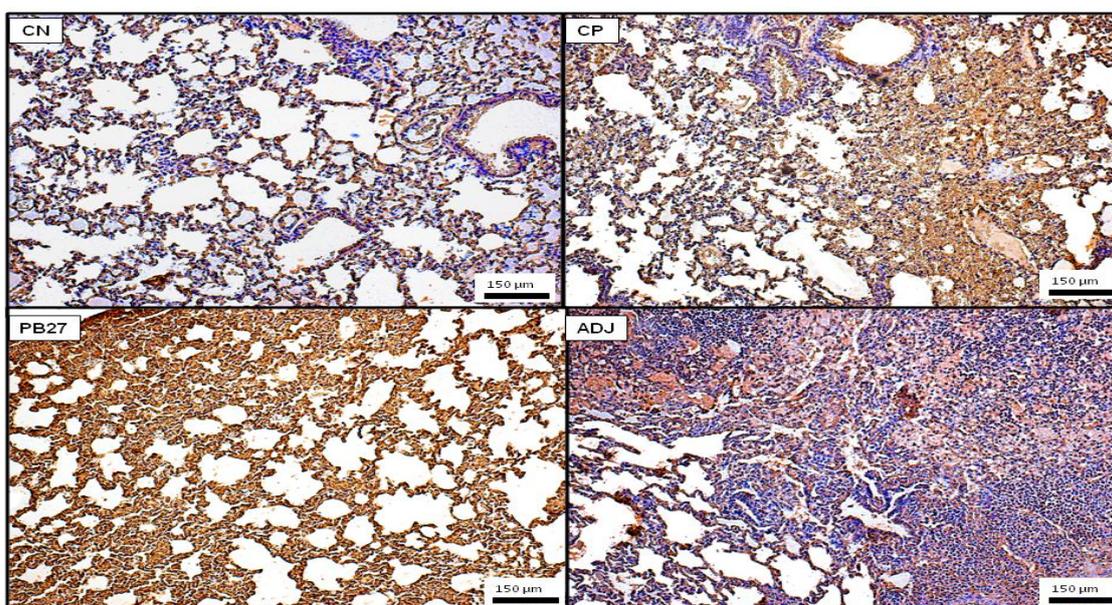


Figura 18. Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de imunohistoquímica 30 dias após infecção desafio demonstrando a imunolocalização do receptor TLR 4. Após 30 dias de infecção por *P. brasiliensis*, foi efetuada a técnica de Imunohistoquímica para avaliar a expressão do receptor **TLR 4** no pulmão dos animais. Imagens obtidas com a utilização de lente objetiva de aumento 10x. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante e (PB27) imunizado.

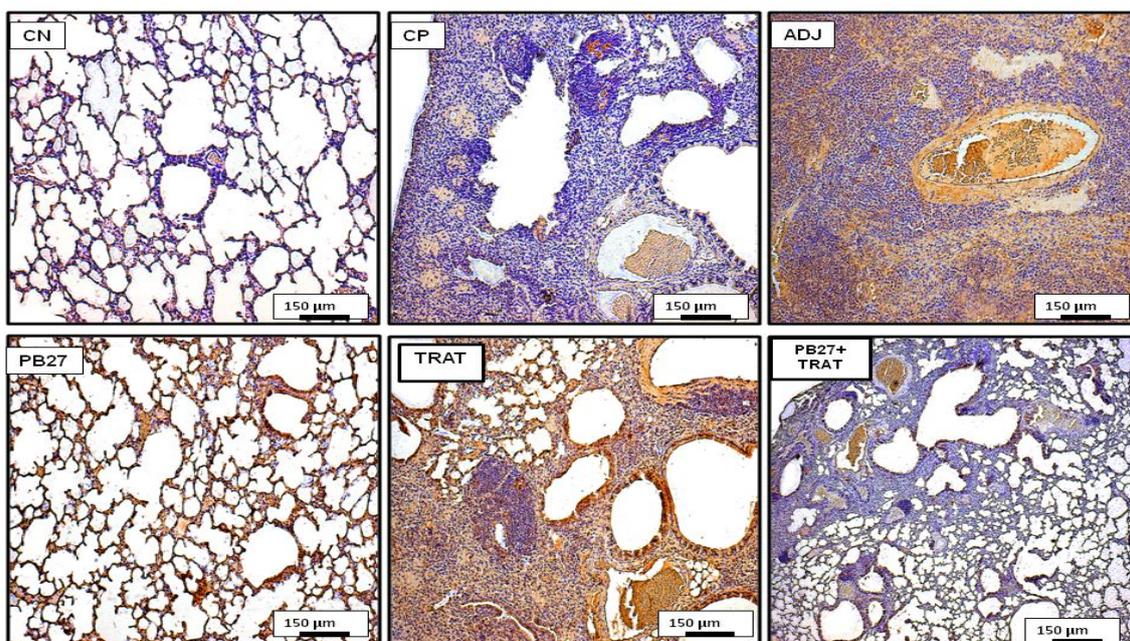


Figura 19. Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de imunohistoquímica 90 dias após infecção desafio demonstrando a imunolocalização do receptor TLR 4. Após 90 dias de infecção por *P. brasiliensis*, foi efetuada a técnica de Imunohistoquímica para avaliar a expressão do receptor **TLR 4** no pulmão dos animais. As imagens foram adquiridas utilizando lente objetiva de aumento de 10x. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante, (PB27) imunizado, (PB27+TRAT) imunizado e tratado e (TRAT) tratado.

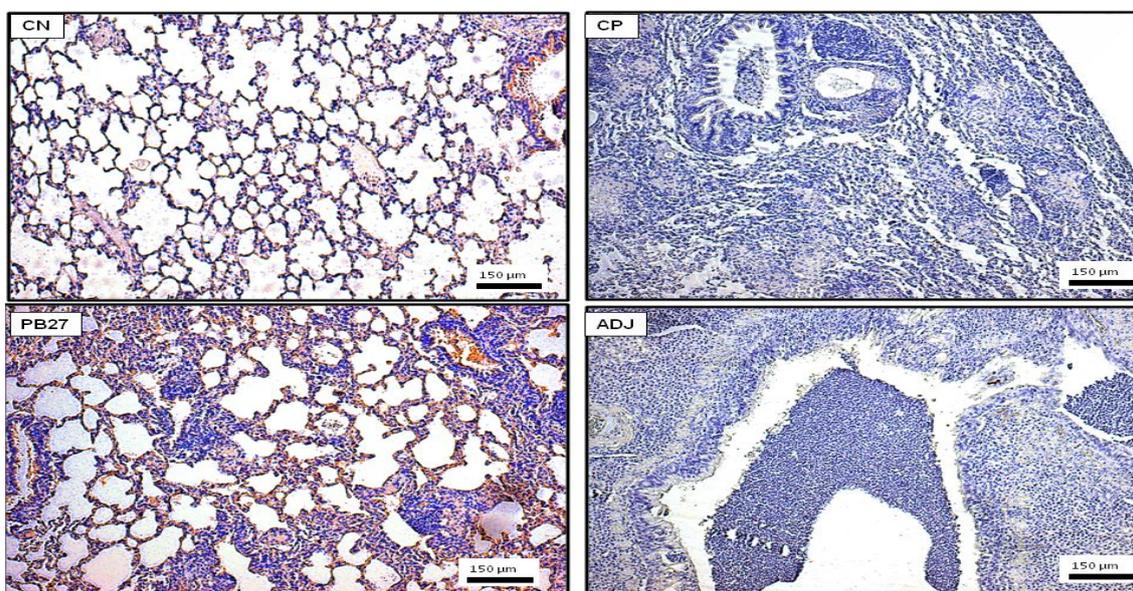


Figura 20. Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de imunohistoquímica 30 dias após infecção desafio demonstrando a imunolocalização de VEGFR-2. Após 30 dias de infecção por *P. brasiliensis*, foi efetuada a técnica de Imunohistoquímica para avaliar a expressão do receptor **VEGFR-2** no pulmão dos animais. Imagens obtidas com lente objetiva de aumento de 10x. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante e (PB27) imunizado.

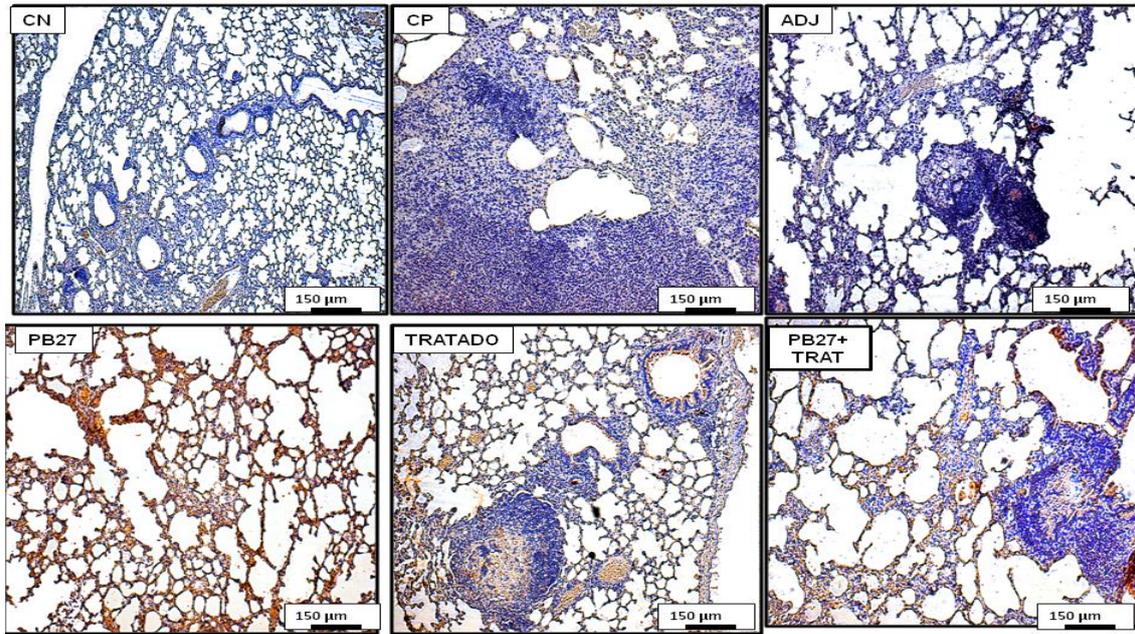


Figura 21. Microscopia de pulmão de camundongo, marcado pela técnica de imunohistoquímica 90 dias após infecção desafio, demonstrando a imunolocalização de VEGFR2. Após 90 dias de infecção por *P. brasiliensis*, foi efetuada a técnica de Imunohistoquímica para avaliar a expressão do receptor **VEGFR-2** no pulmão dos animais. As imagens foram obtidas utilizando lente objetiva de aumento de 10x. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante, (PB27) imunizado, (PB27+ TRAT) imunizado e tratado e (TRAT) tratado.

5.5. WESTERN BLOT

A técnica de western blot foi utilizada com o intuito de mensurar quantidades relativas de determinadas proteínas e de analisar as diferenças nos níveis de expressão destas proteínas presentes nos homogeneizados de tecido (extrato pulmonar) dos diferentes grupos experimentais.

A técnica foi utilizada na avaliação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a análise dos filmes permitiu observar que 30 dias após a infecção por *P. brasiliensis*, os grupos controle positivo (CP) e adjuvante (ADJ) tiveram expressão significativamente menor de VEGF, quando comparados aos grupos controle negativo (CN) e imunizado (PB27) (Figura 22A).

Noventa dias após a infecção desafio, a análise dos filmes, permitiu observar que os grupos imunizados (PB27 e PB27+ TRAT) e o grupo controle negativo (CN), tiveram expressão significativamente maior de VEGF quando comparados com os demais grupos experimentais (CP, TRATADO, ADJ). O Grupo adjuvante, entre os grupos, foi o que teve menor expressão de VEGF, nos dois Pontos de Morte (30 e 90 dias após infecção desafio). Não houve diferença estatística quando se comparou o grupo controle negativo com os Grupos imunizados em ambos os pontos (Figura 22B).

A técnica de Western blot também foi utilizada com a finalidade de determinar os níveis de morte celular a partir da detecção da enzima Caspase 3 ativa. A análise dos filmes nos permitiu identificar que, 30 dias após a infecção desafio, o grupo imunizado (PB27) expressou níveis significativamente maiores de caspase 3 ativa, em relação aos demais grupos experimentais (Figura 23A). Noventa dias após a infecção desafio, pôde-se observar ao analisar os filmes, que o grupo adjuvante, quando comparado com os demais grupos, foi o grupo em que detectou-se menores níveis de Caspase 3 ativa, enquanto, no grupo imunizado (PB27), foi possível constatar uma diferença significativamente maior na expressão desta enzima quando comparada ao controle positivo (Figura 23B).

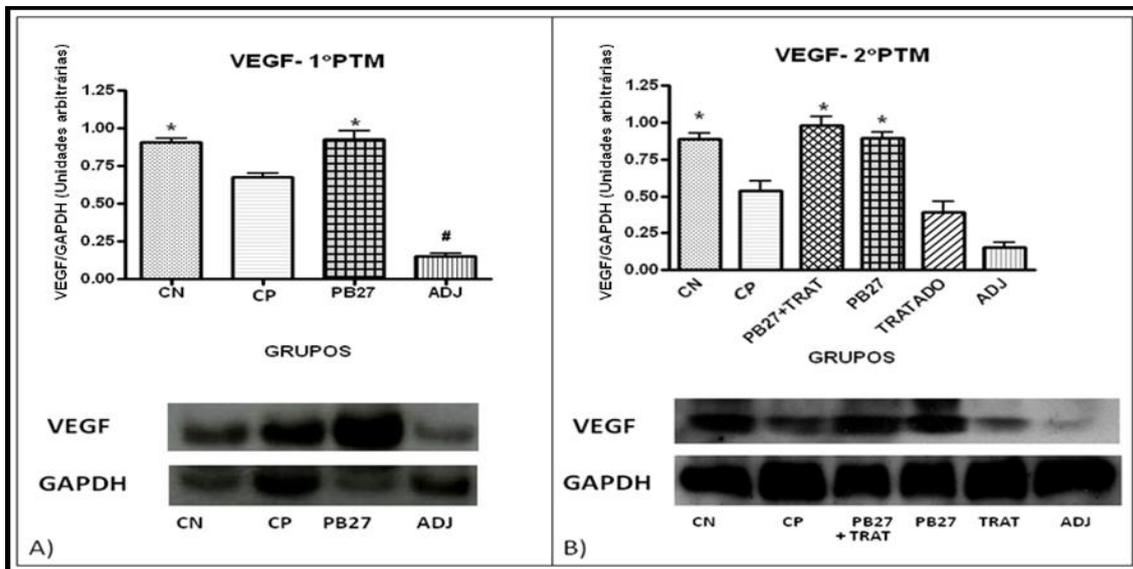


Figura 22. Western Blot de extrato pulmonar 30 e 90 dias após a infecção por *P. brasiliensis* demonstrando a expressão de VEGF. Western blot de extrato pulmonar para avaliar a expressão do VEGF no pulmão dos animais. A) Trinta dias após a infecção desafio. B) Noventa dias após infecção desafio. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante, (PB27) imunizado, tratado (TRAT), imunizado e tratado (PB27+ TRAT). * $p < 0,05$ em relação ao controle positivo.

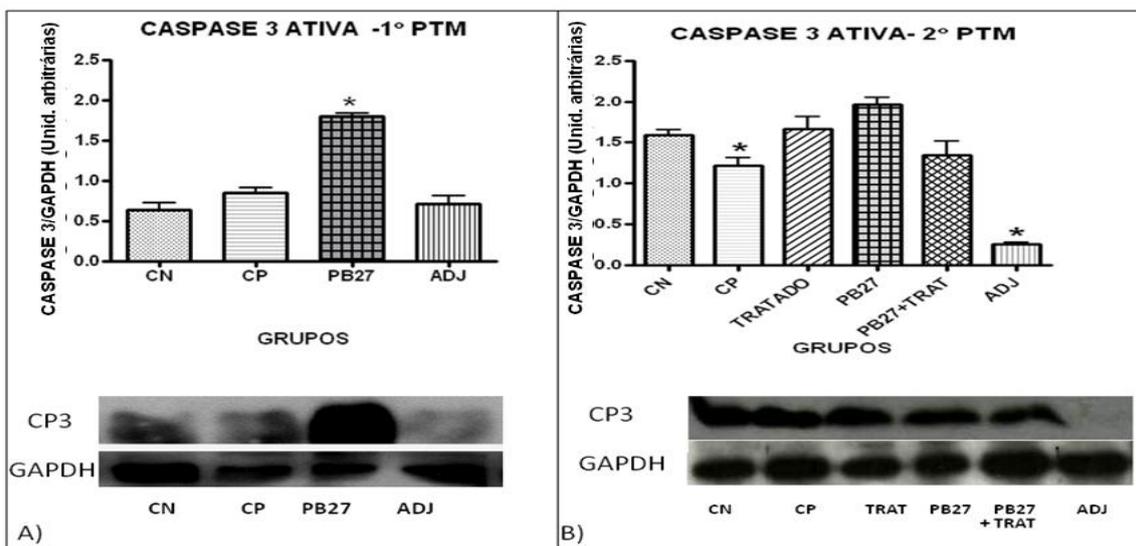


Figura 23. Western Blot de extrato pulmonar 30 e 90 dias após a infecção por *P. brasiliensis* demonstrando a expressão de Caspase 3 ativa. Western blot de extrato pulmonar para avaliar os níveis de Caspase 3 ativa nos grupos experimentais. A) 30 dias após a infecção desafio. B) 90 dias após infecção desafio. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante, (PB27) imunizado, tratado (TRAT), imunizado e tratado (PB27+ TRAT). A) * $p < 0,05$ diferença estatística em relação aos demais grupos. B) * $p < 0,05$ diferença estatística em relação ao imunizado (Pb27).

Além disso, foi feito western blot com o intuito de detectar a presença e mensurar os níveis de receptores de quimiocina CCR7 nos pulmões dos animais dos grupos experimentais.

A análise nos permitiu destacar que 30 dias após a infecção por *P. brasiliensis*, o grupo adjuvante obteve níveis significativamente maiores deste receptor nos pulmões (Figura 24A). Ao passo que, no segundo Ponto de Morte, os grupos tratado e adjuvante obtiveram níveis expressivamente maiores quando comparados com os demais grupos (Figura 24B).

A técnica de western blot foi utilizada também para mensurar os níveis de expressão dos receptores tipo Toll 2 e 4 nos pulmões dos animais. A análise dos filmes evidenciou que, o receptor TLR 2, 30 dias após a infecção desafio, teve expressão significativamente alta no grupo adjuvante, enquanto nos demais grupos houve baixos níveis de expressão. No segundo Ponto de Morte, 90 dias após a infecção desafio, os grupos adjuvante e tratado, mostraram níveis estatisticamente maiores de expressão do TLR2 quando comparados com os demais grupos (Figura 25). Todavia, quanto à expressão do receptor tipo TLR 4, 30 dias após a infecção desafio, o grupo imunizado (PB27) apresentou níveis estatisticamente maiores de expressão deste receptor quando comparado com os demais grupos experimentais. Ainda, 90 dias após a infecção desafio os grupos imunizados (PB27, PB27+ TRAT) e o grupo adjuvante (ADJ) apresentaram níveis expressivamente maiores de TLR 4, quando comparados aos grupos Controle (CN e CP), resultado que pode ser observado na Figura 26.

Por conseguinte, a técnica de Western Blot possibilitou a quantificação de fibras colágenas tipo I no pulmão dos animais, assim como, a avaliação dos níveis de fibrose pulmonar. A análise dos filmes permitiu identificar que, 30 dias após a infecção desafio, os grupos controle positivo (CP) e adjuvante (ADJ), possuíam níveis expressivamente maiores de fibras de colágeno no pulmão, quando comparado com os demais grupos. Todavia, 90 dias após a infecção desafio, os grupos controle positivo, tratado e adjuvante tiveram níveis estatisticamente maiores de Colágeno tipo I no pulmão ao serem comparados com os grupos imunizados (PB27 e PB27 + TRAT) e controle negativo (Figura 27).

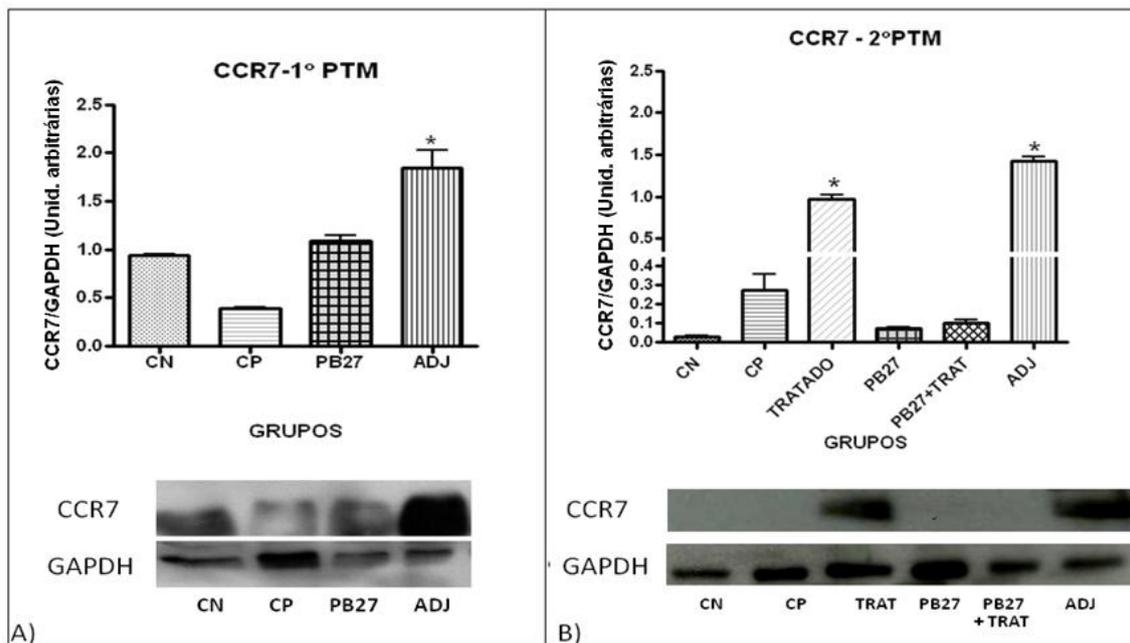


Figura 24. Western Blot de extrato pulmonar 30 e 90 dias após a infecção por *P. brasiliensis* demonstrando a expressão de CCR7. Detecção da presença e mensuramento dos níveis de CCR7 nos grupos experimentais através da expressão do receptor de quimiocina CCR7. A) 30 dias após a infecção desafio. B) 90 dias após infecção desafio. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante, (PB27) imunizado, tratado (TRAT), imunizado e tratado (PB27+ TRAT). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos.

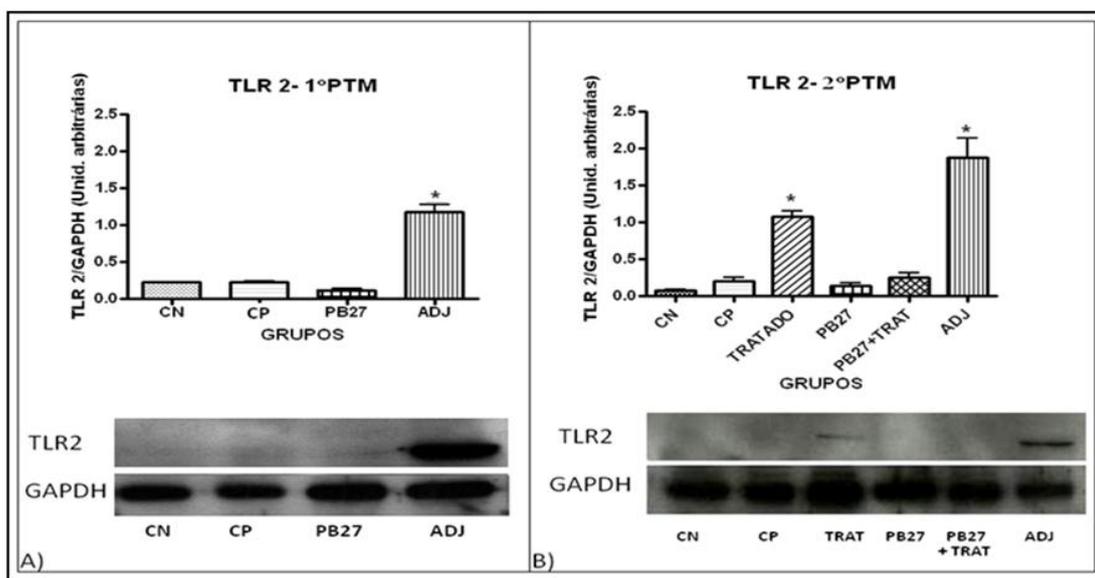


Figura 25. Western Blot de extrato pulmonar 30 e 90 dias após a infecção por *P. brasiliensis* demonstrando a expressão de TLR2. Técnica de Western-blot utilizada para mensurar os níveis de expressão dos receptores TLR2, nos pulmões dos camundongos. A) 30 dias após a infecção desafio. B) 90 dias após infecção desafio. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante, (PB27) imunizado, tratado (TRAT), imunizado e tratado (PB27+ TRAT). * $p < 0,05$ diferença estatística em relação aso demais grupos.

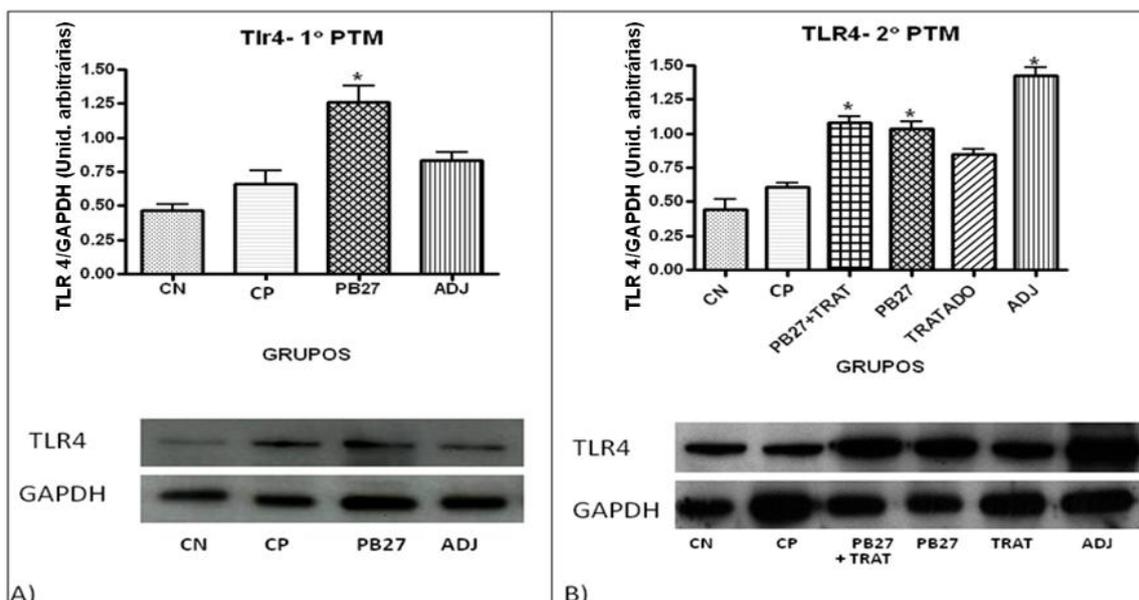


FIGURA 26. Western Blot de extrato pulmonar 30 e 90 dias após a infecção por *P. brasiliensis* demonstrando a expressão de TLR4. Foi utilizada Técnica de Western-blot para mensurar os níveis de expressão dos receptores TLR 4, nos pulmões dos animais imunizados e Infectados. A) 30 dias após a infecção desafio. B) 90 dias após infecção desafio. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante, (PB27) imunizado, tratado (TRAT), imunizado e tratado (PB27+ TRAT). * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao controle negativo .

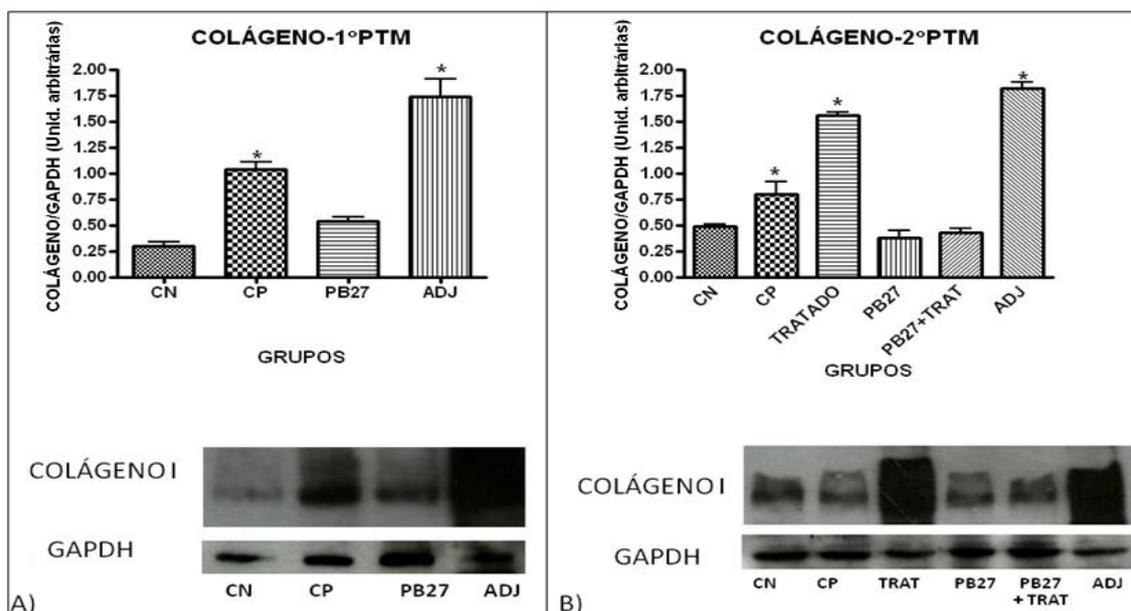


Figura 27. Western Blot de extrato pulmonar 30 e 90 dias após a infecção por *P. brasiliensis* demonstrando a expressão de colágeno do tipo I. Foi utilizada a técnica de Western-blot para quantificação de Colágeno tipo I, nos pulmões dos animais. A) 30 dias após a infecção desafio. B) 90 dias após infecção desafio. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante, (PB27) imunizado, tratado (TRAT), imunizado e tratado (PB27+ TRAT). * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao imunizado.

5.6- PCR EM TEMPO REAL

Os ensaios de PCR foram realizados com o cDNA obtido a partir do RNA total extraído dos pulmões dos camundongos dos grupos experimentais, coletados 30 e 90 dias após a infecção desafio. Esse ensaio foi utilizado para verificar o perfil de expressão gênica de citocinas e de determinadas proteínas e enzimas, produzidas pelos grupos experimentais. Os resultados indicam a quantificação relativa da expressão gênica normalizada em relação ao gene constitutivo (β -actina) em cada grupo analisado utilizando o método ($2^{\Delta\Delta CT}$). O controle negativo, composto por animais que não sofreram intervenção, foi utilizado para obtenção dos níveis basais de expressão. A partir desses níveis de expressão, os níveis comparativos de expressão dos demais grupos foram determinados.

A partir da análise de expressão de IFN- γ nos pulmões dos animais, foi possível visualizar que, após 30 dias de infecção, o grupo imunizado (PB27), apresentou maiores níveis de expressão de IFN- γ quando comparado aos demais grupos, e foi o único grupo que expressou níveis estatisticamente superiores ao nível de expressão basal desta citocina. Já no segundo ponto de morte, 90 dias após a infecção desafio, os grupos controle positivo, adjuvante e tratado, tiveram maiores níveis de expressão do que os grupos imunizados (PB27 e PB27+TRAT), porém, apenas o grupo tratado apresentou níveis estatisticamente superiores aos níveis basais de expressão (Figura 28).

Com relação a expressão de TNF- α , 30 dias após a infecção desafio, o grupo controle positivo, expressou níveis expressivamente menores que os basais de TNF- α . Entretanto, 90 dias após a infecção desafio, pode-se observar que os grupos tratado e adjuvante apresentaram uma superexpressão gênica de TNF- α , tendo o grupo adjuvante, níveis estatisticamente maiores que todos os grupos. Os demais grupos (CP, PB27, PB27+ TRAT), apresentaram níveis compatíveis com os basais (Figura 29).

A análise dos níveis de expressão relativa de TGF- β , 30 dias após a infecção desafio, mostrou que o grupo imunizado (PB27), apresentou superexpressão deste gene em relação aos níveis basais e ainda, obteve expressão

significativamente maior do que os demais grupos (ADJ, CP). Entre os grupos infectados (CP, PB27 e ADJ) o grupo controle positivo obteve expressão estatisticamente menor que os grupos imunizado e adjuvante. Além disso, 90 dias após a infecção desafio, o grupo e adjuvante (ADJ), obteve níveis significativamente maiores de expressão em relação ao nível basal e aos demais grupos (CP, TRATADO, PB27 e PB27+TRAT) (Figura 30).

Os níveis pulmonares de IL-6, 30 dias após a infecção desafio, foram expressivamente maiores nos grupos controle positivo e adjuvante enquanto o grupo imunizado apresentou nível similar ao basal. Da mesma forma, 90 dias após a infecção desafio, os grupos adjuvante e controle positivo mantiveram níveis expressivamente maiores de IL-6, em relação aos níveis basais e aos grupos imunizados (PB27 e PB27+TRAT). Contudo, o grupo tratado, apresentou níveis estatisticamente superiores aos demais grupos (Figura 31).

Todos os grupos apresentaram um aumento expressivo no nível da citocina IL-10, sendo que, o grupo adjuvante, apresentou um nível significativamente maior em relação aos demais grupos. Já no segundo Ponto de Morte, 90 dias após a infecção desafio, de maneira geral, os níveis expressão foram menores do que no Primeiro Ponto (30 dias), contudo, os grupos tratado e adjuvante e tiveram níveis de expressão estatisticamente maiores do que o basal. Os grupos imunizados (PB27, PB27+TRAT), tiveram níveis de expressão significativamente inferiores aos demais grupos infectados (CP, ADJ, TRAT), resultado que pode ser observado na Figura 32.

Foram mensurados também pela técnica de PCR em Tempo Real, os níveis de IL-4. Estes, 30 dias após a infecção desafio (1PTM), quando comparados aos níveis basais de expressão, foram significativamente maiores nos grupos controle positivo e adjuvante, sendo o imunizado, entre os grupos que sofreram intervenção, o grupo que menos expressou IL-4. Porém, 90 dias após a infecção desafio (2 PTM), todos os grupos tiveram os níveis de expressão abaixo do basal (Figura 33). A Tabela IV mostra de maneira simplificada a expressão das citocinas quantificadas neste trabalho.

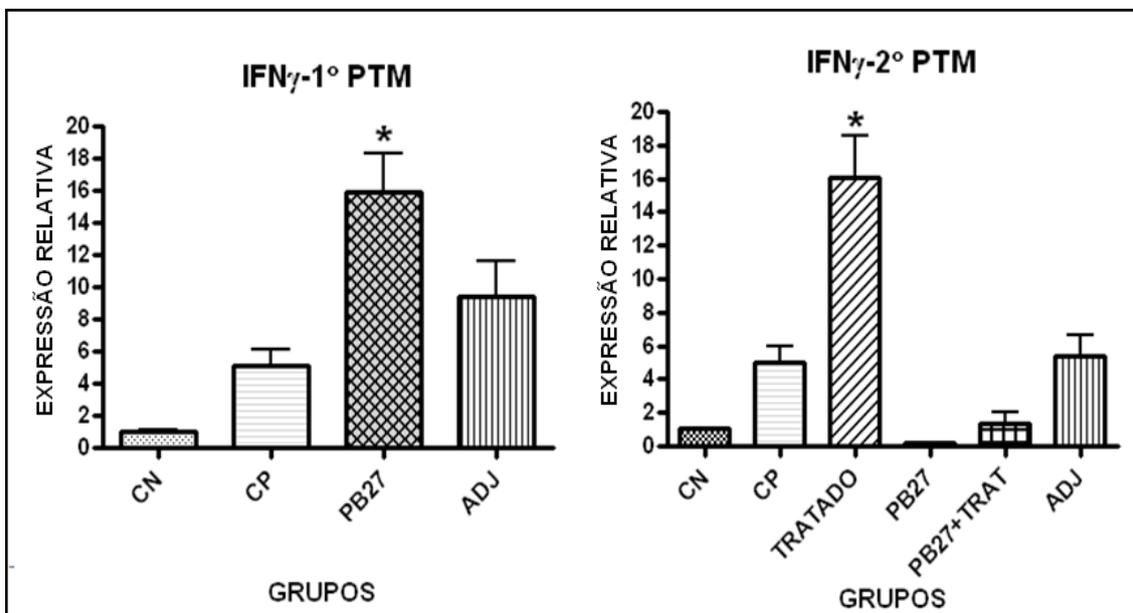


Figura 28: Expressão relativa de IFN- γ nos pulmões de camundongos cometidos pela infecção por *P. brasiliensis*. Após 30 (1° PTM) e 90 (2° PTM) dias de infecção, os pulmões dos animais foram utilizados para extração do mRNA e posterior dosagem da expressão relativa de IFN- γ . O grupo controle negativo (CN) foi utilizado para obtenção dos níveis basais de expressão * $p < 0,05$ em relação aos níveis basais e aos demais grupos.

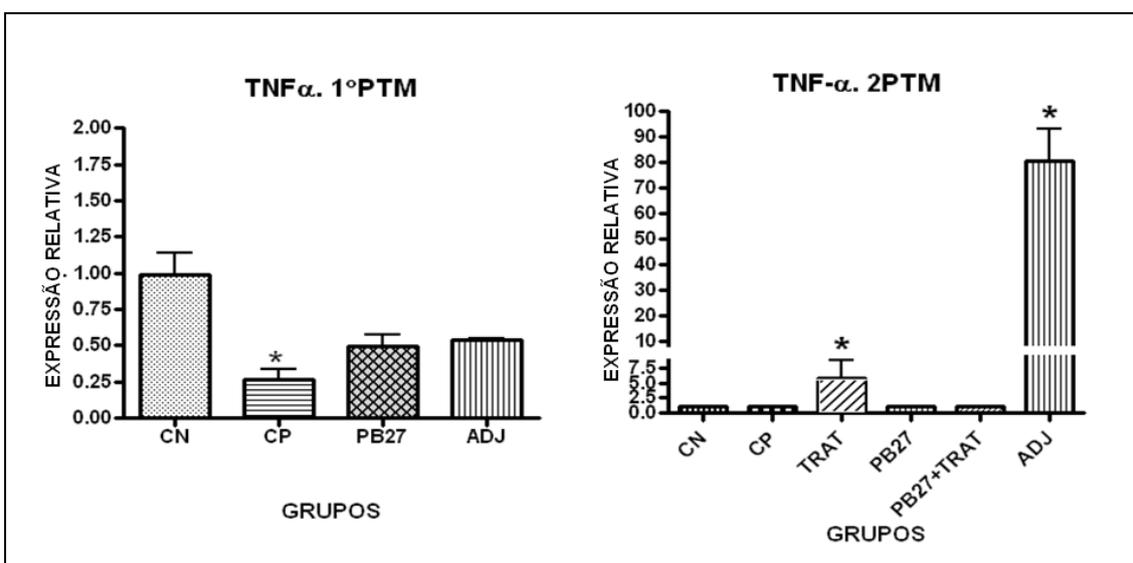


Figura 29: Expressão relativa de TNF- α nos pulmões de camundongos cometidos pela infecção por *P. brasiliensis*. Após 30 (1° PTM) e 90 (2° PTM) dias de infecção, os pulmões dos animais foram utilizados para extração do mRNA e posterior dosagem da expressão relativa de TNF- α . O grupo controle negativo (CN) foi utilizado para obtenção dos níveis basais de expressão 1PTM* ($p < 0,05$) em relação aos níveis basais, 2PTM* ($p < 0,05$) em relação aos níveis e aos demais grupos.

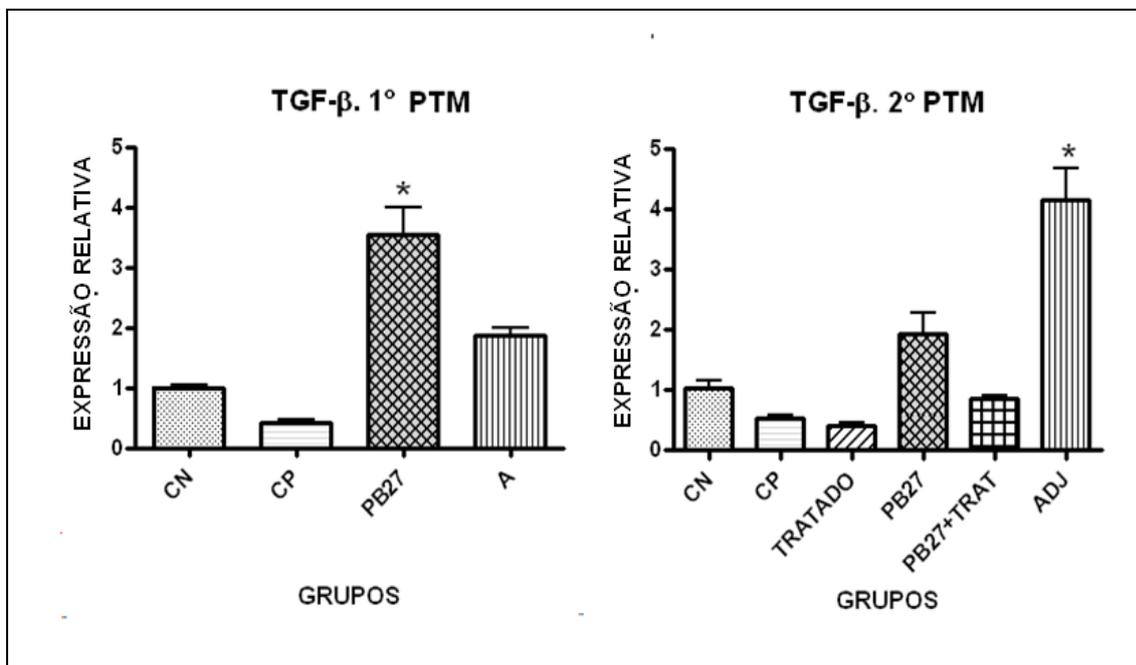


Figura 30. Expressão relativa de TGF-β nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*. Após 30 (1° PTM) e 90 (2° PTM) dias de infecção, os pulmões dos animais foram utilizados para extração do mRNA e posterior dosagem da expressão relativa de TGF-β. O grupo controle negativo (CN) foi utilizado para obtenção dos níveis basais de expressão * ($p < 0,05$) em relação aos níveis basais de expressão e aos demais grupos.

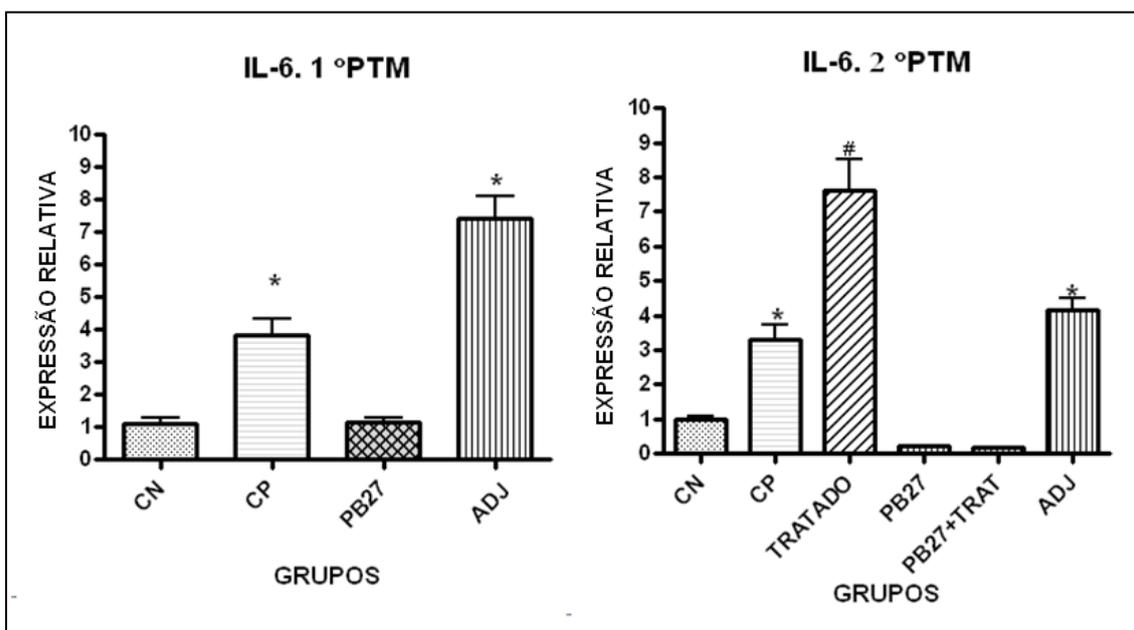


Figura 31. Expressão relativa de IL-6 nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*. Após 30 (1° PTM) e 90 (2° PTM) dias de infecção, os pulmões dos animais foram utilizados para extração do mRNA e posterior dosagem da expressão relativa de IL-6. O grupo controle negativo (CN) foi utilizado para obtenção dos níveis basais de expressão * ($p < 0,05$), # ($p < 0,001$) em relação aos níveis basais de expressão e aos demais grupos.

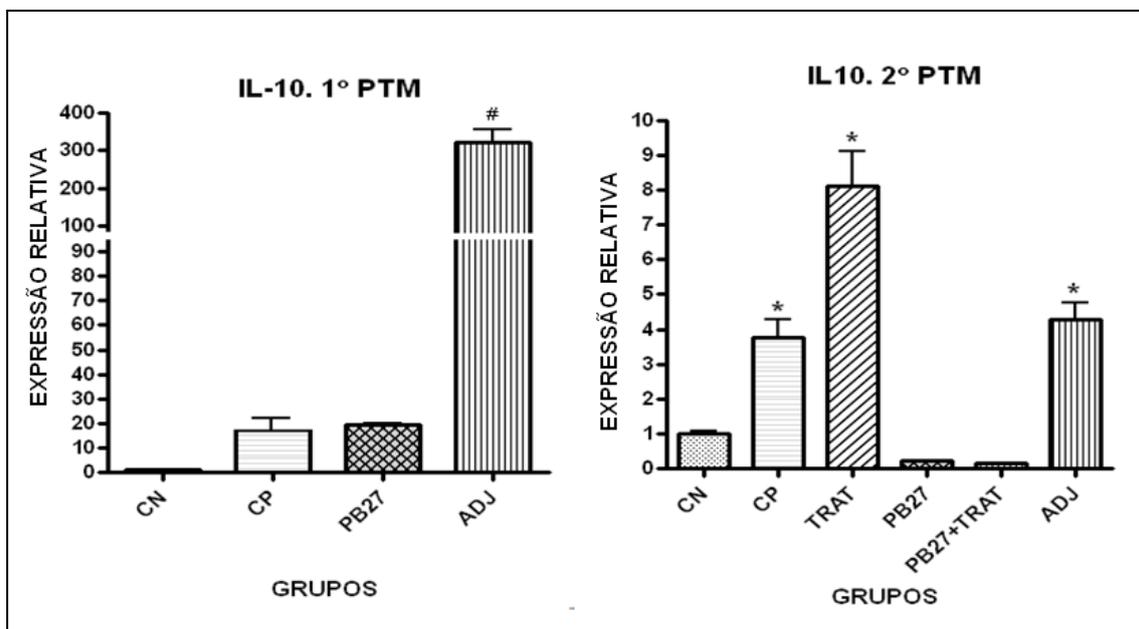


Figura 32. Expressão relativa de IL-10 nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*. Após 30 (1° PTM) e 90 (2° PTM) dias de infecção, os pulmões dos animais foram utilizados para extração do mRNA e posterior dosagem da expressão relativa de IL- 10. O grupo controle negativo (CN) foi utilizado para obtenção dos níveis basais de expressão * ($p < 0,05$) = diferença significativa em relação à expressão basal e aos demais grupos.

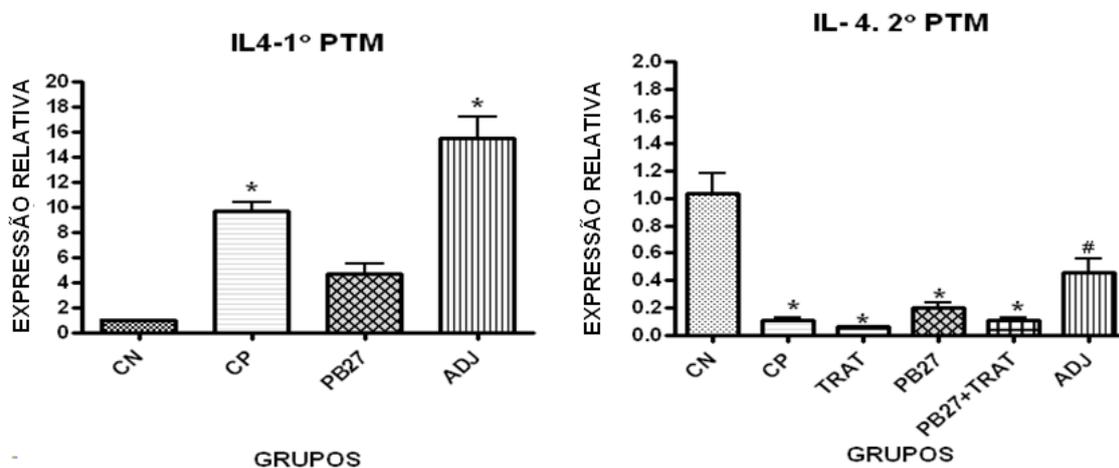


Figura 33. Expressão relativa de IL-4 nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*. Após 30 (1° PTM) e 90 (2° PTM) dias de infecção, os pulmões dos animais foram utilizados para extração do mRNA e posterior dosagem da expressão relativa de IL- 4. O grupo controle negativo (CN) foi utilizado para obtenção dos níveis basais de expressão 1PTM * ($p < 0,05$) diferença significativa em relação à expressão basal.

Em relação à dosagem da enzima iNOS, o grupo adjuvante teve maiores níveis de expressão relativa nos dois Pontos de Morte, sendo que no de 30 dias após a infecção desafio (1ºPTM), todos os grupos, além do adjuvante, apresentaram níveis estatisticamente similares ao nível basal. Todavia, 90 dias após a infecção desafio (2ºPTM), além do adjuvante, o grupo tratado também níveis superiores aos basais (Figura 34).

Os níveis de expressão gênica da enzima eNOS também foram determinados e 30 dias após a infecção desafio, o grupo controle positivo teve níveis de expressão significativamente inferiores aos basais, ao contrário, o Grupo imunizado apresentou níveis significativamente superiores aos basais, tendo ainda, apresentado níveis estatisticamente maiores de expressão em relação aos demais grupos. Além disso, no 2º PTM (90 DIAS), o grupo imunizado foi o único que apresentou níveis de expressão semelhantes ao basal, tendo os demais grupos (CP, TRATADO, PB27+TRAT e ADJ) apresentado expressão gênica inferior à basal, como pode ser observado na Figura 35.

Foram estabelecidos os níveis de **VEGFR-2** (KDR/FIk-1), que 30 dias após a infecção por *P. brasiliensis*, apresentou expressão estatisticamente menor no grupo adjuvante e maior no grupo imunizado, quando comparados ao nível basal. Ainda, o grupo imunizado, quando comparado aos demais grupos, apresentou níveis significativamente maiores de expressão. Do mesmo modo, 90 dias após a infecção por *P. brasiliensis*, os grupos imunizados (PB27 e PB27+TRAT), também apresentaram níveis de expressivamente maiores em relação aos níveis basais e quando comparados aos demais grupos (CP, TRATADO E ADJ) (Figura 36).

Igualmente, utilizando a técnica de PCR em tempo real, foram determinados os níveis de VEGF e 30 dias após a infecção desafio, o grupo adjuvante apresentou expressão significativamente inferior de VEGF, ao passo que, o grupo imunizado, apresentou expressão significativamente superior, quando comparados ao nível basal de expressão. Da mesma forma, 90 dias após a infecção desafio, o grupo imunizado, foi o único que apresentou níveis similares e não significativamente inferiores em relação ao nível basal. Sendo assim, os demais grupos, (CP, TRATADO, PB27 + TRAT e ADJ), apresentaram

níveis de VEGF, tanto inferiores aos níveis basais quanto inferiores ao grupo imunizado (PB27), como pode ser visto na Figura 37. Por fim, foram detectados os níveis de TLR-4 e seu nível de expressão gênica, 30 dias após a infecção desafio foi superior nos grupos adjuvante e imunizado, no segundo PTM (90 dias), o grupo controle positivo, imunizado e adjuvante, apresentaram níveis de expressão estatisticamente maiores TLR-4 (Figura 38).

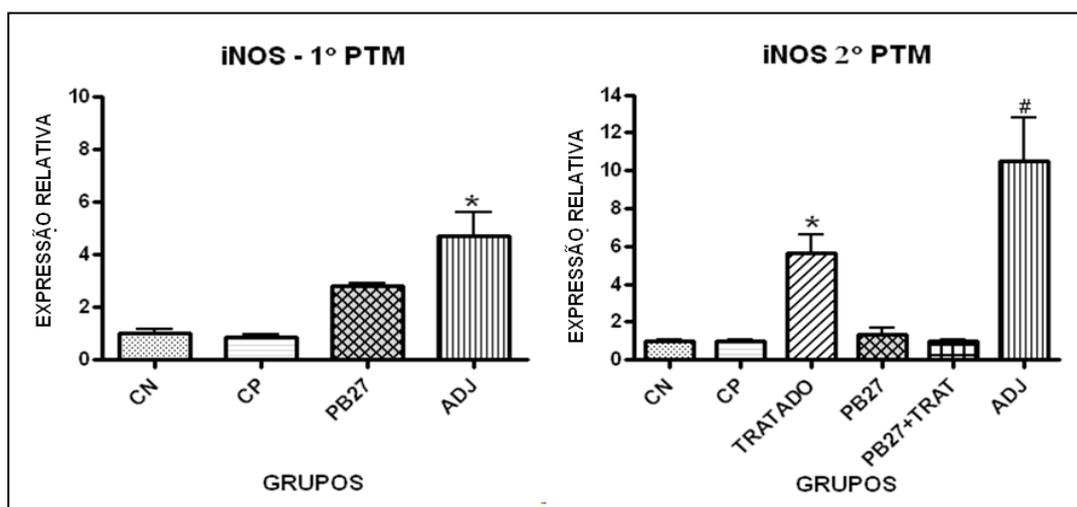


Figura 34. Expressão relativa da enzima iNOS nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*. Após 30 (1° PTM) e 90 (2° PTM) dias de infecção, os pulmões dos animais foram utilizados para extração do mRNA e posterior dosagem da expressão relativa de iNOS. O grupo controle negativo (CN) foi utilizado para obtenção dos níveis basais de expressão * ($p < 0,01$); #. ($p < 0,001$) diferença significativa em relação à expressão basal e aos demais grupos.

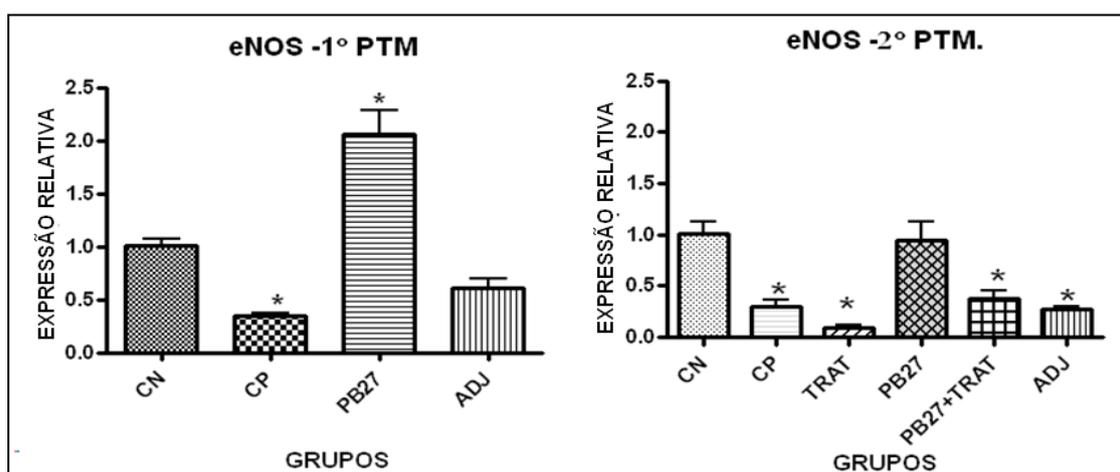


Figura 35. Expressão relativa de eNOS nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*. Após 30 (1° PTM) e 90 (2° PTM) dias de infecção, os pulmões dos animais foram utilizados para extração do mRNA e posterior dosagem da expressão relativa de eNOS. O grupo controle negativo (CN) foi utilizado para obtenção dos níveis basais de expressão. * ($p < 0,05$) diferença em relação à expressão basal e aos demais grupos.

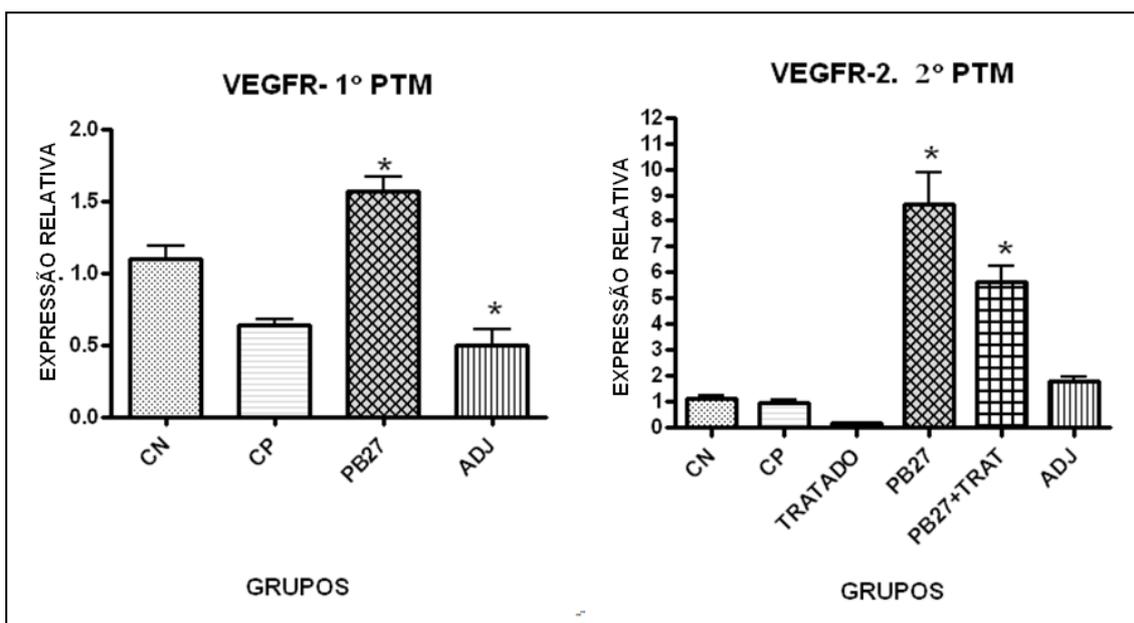


Figura 36. Expressão relativa do receptor, VEGFR2, nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*. Após 30 (1° PTM) e 90 (2° PTM) dias de infecção, os pulmões dos animais foram utilizados para extração do mRNA e posterior dosagem da expressão relativa de VEGFR2. O grupo controle negativo (CN) foi utilizado para obtenção dos níveis basais de expressão. * ($p < 0,05$) diferença significativa em relação à expressão basal.

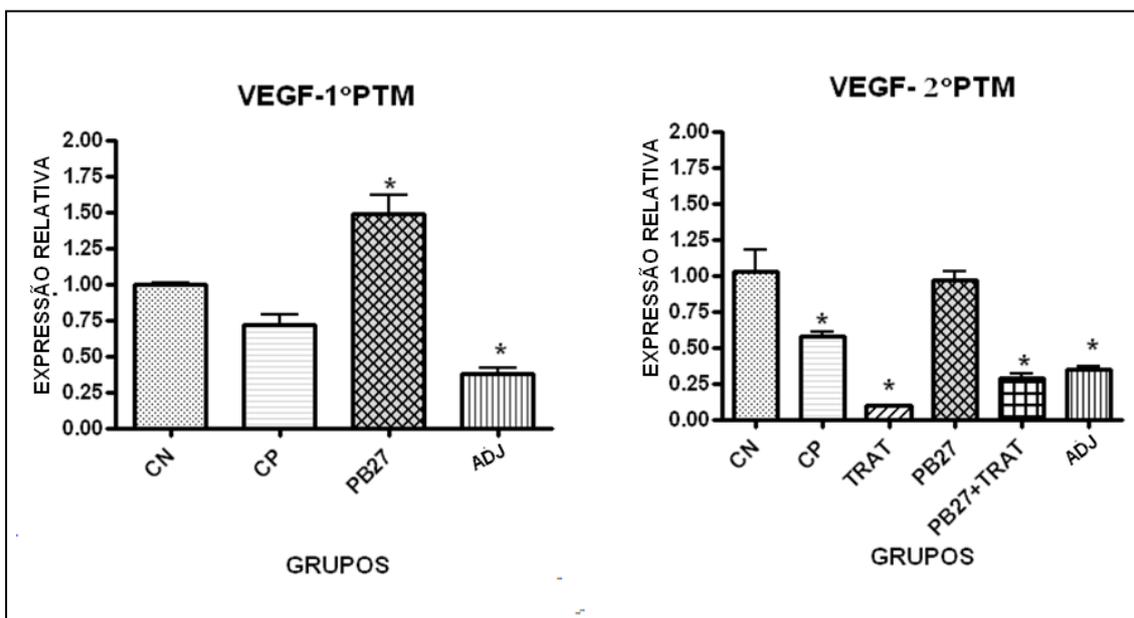


Figura 37. Expressão relativa de VEGF nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*. Após 30 (1° PTM) e 90 (2° PTM) dias de infecção, os pulmões dos animais foram utilizados para extração do mRNA e posterior dosagem da expressão relativa de VEGF. O grupo controle negativo (CN) foi utilizado para obtenção dos níveis basais de expressão. * ($p < 0,05$) diferença em relação aos níveis bsais de expressão.

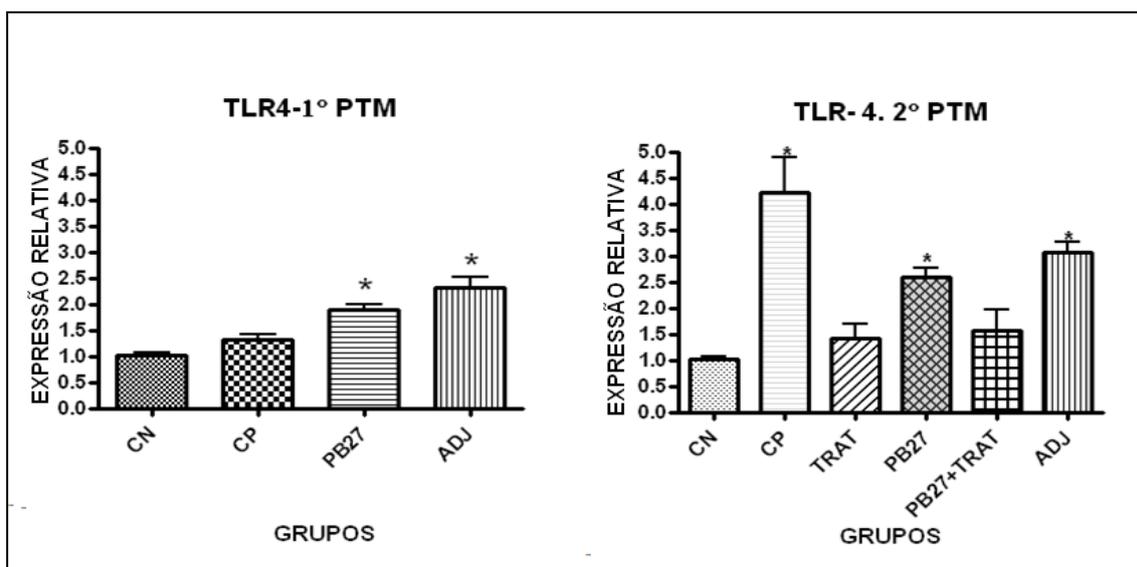


Figura 38. Expressão relativa de TLR-4 nos pulmões de camundongos acometidos pela infecção por *P. brasiliensis*. Após 30 (1° PTM) e 90 (2° PTM) dias de infecção, os pulmões dos animais foram utilizados para extração do mRNA e posterior dosagem da expressão relativa de TLR-4. O grupo controle negativo (CN) foi utilizado para obtenção dos níveis basais de expressão. * ($p < 0,05$).

TABELA IV. Expressão de citocinas durante a infecção desafio. A tabela mostra de maneira simplificada a expressão das citocinas quantificadas 30 e 90 dias após a infecção desafio pela técnica de RT-PCR, onde a comparação foi feita a com o controle negativo, que foi utilizado para obter níveis basais de expressão. As setas representam se os níveis de expressão foram inferiores (\downarrow), superiores (\uparrow) ou sem diferença significativa (\leftrightarrow) em relação ao nível basal. Grupos: (CN) controle negativo, (CP) controle positivo, (ADJ) adjuvante, (PB27) imunizado, tratado (TRAT), imunizado e tratado (PB27+ TRAT).

EXPRESSION DE CITOCINAS APÓS A INFECÇÃO DESAFIO										
Citocinas	30 dias após infecção desafio				90 dias após a infecção desafio					
	CN	CP	PB27	ADJ	CN	CP	TRAT	PB27	PB27+TRAT	ADJ
INF- γ	BASAL	\leftrightarrow	\uparrow	\leftrightarrow	BASAL	\leftrightarrow	\uparrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow
TNF	BASAL	\downarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	BASAL	\leftrightarrow	\uparrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\uparrow
IL-4	BASAL	\uparrow	\leftrightarrow	\uparrow	BASAL	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow
TGF- β	BASAL	\leftrightarrow	\uparrow	\leftrightarrow	BASAL	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\uparrow
IL-10	BASAL	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\uparrow	BASAL	\uparrow	\uparrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\uparrow
IL-6	BASAL	\uparrow	\leftrightarrow	\uparrow	BASAL	\uparrow	\uparrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\uparrow

VI. DISCUSSÃO

A Paracoccidioidomicose é uma doença típica do indivíduo da zona rural e suburbana, sendo o trato respiratório considerado a porta de entrada mais frequente para a infecção, que comumente manifesta-se como uma pneumopatia de um curso crônico (Martinez, 2010).

O agente etiológico, *P. brasiliensis*, apresenta em sua constituição uma multiplicidade de componentes antigênicos. Estes antígenos podem ser extraídos da parede celular do fungo, do conteúdo citoplasmático ou, ainda, do filtrado de cultura. Pesquisas visando à obtenção de antígenos de *P. brasiliensis* vêm sendo realizadas desde o início do século passado, a partir de 1960, as pesquisas relacionadas à caracterização de antígenos de *P. brasiliensis* apresentaram aumento significativo, estas pesquisas visam diferentes objetivos, tais como, avaliação da imunidade humoral, produção de vacinas e diagnóstico de PCM (Fernandes, 2011).

Um dos antígenos que vem sendo estudado desde 1996 e tem demonstrado grande potencial como marcador para imunodiagnóstico da PCM, bem como, indutor de resposta imune protetora é a proteína de 27 kDa, denominada Pb27r. A proteína de 27-kDa foi clonada originalmente e usada como marcador imunológico em 1996 (McEwen *et. al.*, 1996), posteriormente, Ortiz e colaboradores a usaram na detecção de anticorpos em pacientes com PCM através de ensaios de ELISA (Ortiz *et. al.*, 1998). Essa proteína também foi utilizada em conjunto com a proteína p87 para detectar anticorpos em pacientes com PCM (Diez *et. al.*, 2003) e mostrou um nível significativo de proteção nos pulmões, baços e fígados de camundongos imunizados com Pb27r e posteriormente desafiados com uma cepa virulenta de *P. brasiliensis* (Reis *et. al.*, 2008). Recentemente, a Pb27r foi utilizada por Fernandes e colaboradores (2011), associada à proteína Pb40, para uso na terapia e no Imunodiagnóstico da PCM.

Apesar da relevância desta proteína e de anos de utilização da mesma em várias pesquisas, pouco se tem estudado sobre a resposta inflamatória e

mecanismos de ação promovidos pela imunização pela PB27. Este é um dos problemas que impossibilita sua utilização em aplicações como vacinas. Assim sendo, o estudo da resposta inflamatória induzida pela imunização se faz necessário e relevante.

O presente trabalho visou melhorar o entendimento sobre a resposta imune e inflamatória promovida pela imunização com a proteína Pb27r associada ou não ao tratamento com o Fluconazol. O Fluconazol é um medicamento antifúngico triazólico, que é múltiplo composto sintético contendo três átomos de nitrogênio no anel azol. Os medicamentos antifúngicos triazólicos são de amplo espectro e são usados atualmente para tratar infecções causadas por fungos patogênicos diversos. Esses medicamentos inibem a síntese de ergosterol, que é um componente essencial das membranas celulares de fungos, que causam alterações na permeabilidade da membrana, causando a morte da célula (Visbal *et. al*, 2005).

As unidades formadoras de colônia foram examinadas após 30 e 90 dias de infecção por *P. brasiliensis*. Este experimento mostrou o efeito protetor da imunização com antígeno de *P. brasiliensis* Pb27r em camundongos Balb/C machos, visto que, a imunização reduziu em 78% os níveis de UFCs 30 dias após a infecção e reduziu para níveis indetectáveis o número de UFCs no pulmão, 90 dias após a infecção desafio. A administração combinada de Pb27r e Fluconazol também determinou redução significativa de UFCs 90 dias após a infecção desafio, sendo esta redução de 90 %. É interessante ressaltar que o tratamento com quimioterápico sozinho (sem imunização prévia) não obteve redução nos níveis de UFCs.

Sendo assim, podemos inferir que a imunização com rPb27 é eficiente em diminuir as UFCs e as lesões granulomatosas no pulmão, sendo a imunização mais eficiente que o tratamento com Fluconazol na redução dos níveis de UFC pulmonar. Ainda, podemos sugerir que a imunização com Pb27r modifica e controla a evolução da infecção pulmonar em camundongos infectados com *P. brasiliensis*. Os resultados de cálculo UFC/ (LOG/g) foram confirmados pela coloração de Grocott, o que permitiu a visualização e confirmação da presença de células fúngicas nos pulmões dos camundongos. Esses achados

corroboram com os estudos já efetuados utilizando a imunização com Pb27r contra *P. brasiliensis*. Reis e colaboradores (2005), mostraram a proteção gerada pela imunização com Pb27r. Fernandes e colaboradores (2011) mostraram o efeito aditivo da associação desta proteína com o quimioterápico Fluconazol. Em ambos os estudos, evidenciou-se uma redução de UFCs no pulmão, baço e fígado de camundongos imunizados com a proteína Pb27r .

As análises histológicas da coloração com HE, 30 dias após a infecção mostraram que os animais imunizados (PB27) não apresentaram lesão digna de nota, apenas um infiltrado inflamatório intersticial perivascular leve, quando comparado ao controle negativo. Além disso, 90 dias após a infecção desafio, este padrão foi mantido e animais imunizados (PB27), novamente, não apresentaram lesão digna de nota. Também foi possível observar apenas um aumento de celularidade no interstício pulmonar, mas as vias aéreas permaneceram desobstruídas. Animais que receberam a imunização associada ao tratamento apresentaram um infiltrado inflamatório multifocal discreto, sem característica granulomatosa. Porém, animais que receberam apenas o tratamento apresentaram granulomas multifocais de intensidade moderada, com presença de células gigantes associadas a células fúngicas. Entretanto, foi possível detectar que o dano tecidual neste grupo foi menor do que o apresentado pelo grupo Infectado (CP).

A análise dos resultados nos permite evidenciar que todos os grupos que receberam algum tipo de tratamento (imunização / Fluconazol), reduziram os níveis de infiltrados inflamatórios em relação ao controle positivo, ou seja, os tratamentos interferem no curso da infecção. Contudo, o grupo que apresentou quadro mais compatível com o controle negativo, (com menor intensidade de infiltrados inflamatórios e lesões teciduais), foi o grupo apenas imunizado (PB27). Ainda comparando os grupos que receberam algum tipo de tratamento (imunização / Fluconazol), o grupo que apresentou maiores lesões entre eles, foi o grupo apenas tratado.

Os infiltrados inflamatórios encontrados em animais infectados por PCM foram constituídos principalmente por linfócitos e histiócitos localizados no interstício. O grupo adjuvante foi o único que apresentou infiltrados neutrofílicos em

grande quantidade e com localização intrabrônquial. Granulomas linfocitocitários já foram descritos por outros autores em PCM experimental, como sendo o tipo de infiltrado o mais prevalente na constituição dos granulomas em PCM (Silva *et. al.*, 2009; SILVA, 1985; Cock *et. al.*, 2000; Fernandes *et. al.*, 2011a). É interessante ressaltar que o grupo adjuvante apresentou redução na carga fúngica, e isto pode estar relacionado à alta capacidade fungicida dos neutrófilos que tem sido discutida por vários autores (Abbas e Lichtman, 2005; Pina *et. al.*, 2006); porém, grupo o adjuvante, além do controle positivo foi o grupo que apresentou maior lesão pulmonar.

Estes achados confirmam novamente a capacidade protetora da Pb27, que entre os tratamentos utilizados, foi o mais eficiente na redução de granulomas e infiltrados inflamatórios, deixando o pulmão livre de obstruções. Novamente, nossos resultados reforçam os dados obtidos por Reis e colaboradores (2008) e Fernandes e colaboradores (2011), que demonstraram a redução da formação granulomatosa na infecção por *P. brasiliensis* após a imunização com a proteína Pb27.

Para detecção dos níveis de fibrose foi utilizada a técnica de Western Blot e também foram feitas análises histológicas com coloração de Tricrômico de Masson, que detectaram colágeno do tipo I no pulmão. Apesar das graves consequências da fibrose nas doenças infecciosas e não infecciosas, os mecanismos de danos teciduais causados pela fibrose não são totalmente compreendidos. A fibrose parece começar simultaneamente com o processo inflamatório e se consolida com a formação de granulomas.

O colágeno é uma escleroproteína que dá as principais características à matriz extracelular e à fibrose. Quando, por circunstâncias geradas por fatores inflamatórios, degenerativos ou neoplásicos, os estímulos para a fibrogênese são ativados, o colágeno ao ser sintetizado pelas células do tecido conjuntivo é depositado extracelularmente e o tecido fibroso se acumula em excesso, constituindo a fibrose (Andrade, 2005). O Colágeno do tipo I é o mais comum, aparece nos tendões, na cartilagem fibrosa, no tecido conjuntivo frouxo comum, no tecido conjuntivo denso (onde é predominante sobre os outros tipos), sempre formando fibras e feixes (Alberts, 1995).

Os resultados obtidos nos experimentos de western blot nos permitiram quantificar os níveis de colágeno do tipo I, 30 dias após a infecção desafio, e a coloração de Tricrômico de Masson nos permitiu ratificar de forma visual e qualitativa os resultados obtidos pela técnica de Western Blot. Os níveis de fibras de colágeno foram estatisticamente menores no grupo imunizado em comparação com os demais grupos infectados. Além disso, 90 dias após a infecção desafio, foi possível observar que os grupos controle positivo, tratado e adjuvante obtiveram maiores níveis de fibras colágenas presentes no pulmão, enquanto os grupos imunizados (PB27 e PB27+ TRAT) apresentaram níveis estatisticamente menores que os demais grupos e estes níveis foram compatíveis aos níveis do controle negativo.

A inflamação crônica e a fibrose tecidual causam significativa morbidade em doenças granulomatosas e pulmonares intersticiais. Uma das características histológicas mais proeminentes de doenças granulomatosas e intersticiais é a aproximação de células mononucleares, fibroblastos e produtos de secreção dos fibroblastos, tais como colágeno. Esta constatação levou à suposição de que células mononucleares produzem fatores solúveis que são responsáveis por iniciar e / ou perpetuar a resposta fibrótica. O suporte para este conceito foi estabelecido por estudos que demonstraram que fatores liberados por células mononucleares podem alterar a proliferação de fibroblastos e a biossíntese de colágeno, além da existência de uma rede de citocinas que atua na regulação da inflamação e fibrose (Elias *et. al* ,1990; Bilate, 2007).

Os resultados aqui mostrados associados com os resultados obtidos na histologia corroboram com o conceito de que o infiltrado inflamatório está relacionado com fibrose, uma vez que demonstraram maiores infiltrados inflamatórios e lesões granulomatosas nos grupos onde foram determinados maiores níveis de fibrose pulmonar (CP, ADJ, TRATADO). Além disso, estes resultados nos levam a interpretar que a imunização com Pb27 é eficiente em diminuir os níveis de formação de fibrose pulmonar causados pela resposta inflamatória contra *P. brasiliensis*, e portanto, Pb27r possibilita a manutenção da função respiratória e diminui sequelas incapacitantes durante a infecção, enquanto o tratamento com o quimioterápico Fluconazol aumenta os níveis de fibrose pulmonar.

Linfócitos T, B e células dendríticas, expressam o receptor de quimiocina CCR7 (Abbas e Lichtman, 2005). O receptor de quimiocina CCR7 desempenha um papel crítico na migração de DCs e linfócitos. A expressão de CCR7 por DCs é induzida, entre outros estímulos, por micróbios e porções microbianas. Os níveis de CCR7 foram mensurados e nossos resultados mostraram uma detecção de maiores níveis deste receptor no pulmão do adjuvante, 30 e 90 dias após a infecção desafio, porém em 90 dias após a infecção desafio o grupo tratado também apresentou níveis significativamente altos deste receptor. Nestes grupos a presença do receptor de quimiocina esteve principalmente dentro de infiltrados inflamatórios.

O grupo adjuvante apresentou infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico e os altos níveis de expressão do receptor de quimiocina CCR7 em animais deste grupo pode estar relacionado com a maior migração de neutrófilos para o pulmão dos animais. Segundo Beauvillain e colaboradores (2011), o receptor de quimiocina CCR7 está associado à quimiotaxia de neutrófilos (Beauvillain *et. al.*, 2011).

Além disso, os grupos que apresentaram maiores níveis de CCR7, são justamente aqueles que apresentaram maiores níveis de fibrose pulmonar (ADJ e TRATADO). Reações inflamatórias, que envolvem um influxo de determinados tipos de células expressando citocinas, quimiocinas e moléculas de superfície celular, precedem e acompanham a fibrose pulmonar.

Várias citocinas e quimiocinas e seus receptores têm sido investigados em relação à sua contribuição para a patogênese da fibrose pulmonar em tuberculose tanto em modelos humanos quanto em animais (Shinoda *et. al.*, 2009; Yoshida *et. al.*, 2011). CCR7 é expressa por células T e B e desempenha um importante papel na quimiotaxia de células T e dendríticas em associação com os seus ligantes. Porém, a expressão de CCR7 é aumentada em formas graves de pneumonias intersticiais idiopáticas (IIP) e pneumonia intersticial usual (UIP), nas quais estes receptores permanecem localizados em áreas focais constituídas de fibroblastos residentes ativados, miofibroblastos e fibrócitos derivados da medula óssea (Choi *et. al.*, 2006). Pierce e colaboradores (2007) mostraram que CCR7 é expresso por fibroblastos na

fibrose idiopática pulmonar primária (PIF) e na pneumonia intersticial usual (UIP), mas não por fibroblastos normais. Trujillo e colaboradores (2010) mostraram que ratos CCR7^{-/-} foram protegidos contra a fibrose pulmonar induzida por bleomicina.

O receptor de quimiocina CCR7 foi detectado em maiores níveis em animais cujos níveis de fibrose foram maiores, e este aumento de fibrose pode ser consequência do maior influxo de células inflamatórias nestes animais, o que não aconteceu em animais imunizados devido à modulação da resposta inflamatória pela proteína. Estes resultados associados aos dados aqui mostrados nos levam a sugerir que o receptor de quimiocina CCR7, pode estar associado à fibrose pulmonar em paracoccidiodomicose.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma proteína sinalizadora que estimula a vascularização e a angiogênese, além de fazer parte do sistema que restaura o fornecimento de oxigênio aos tecidos, quando a circulação de sangue é inadequada. Várias doenças pulmonares são caracterizadas por alterar a expressão desta molécula (Marti, 2000).

Em função de tal importância, neste trabalho os níveis de VEGF foram mensurados através das técnicas de Imunohistoquímica, Western Blot e PCR em tempo real, e foi possível observar a partir dos resultados obtidos, que 30 dias após a infecção desafio, tanto em nível de mRNA quanto a nível protéico, nos grupos CP e ADJ os níveis de expressão VEGF foram significativamente menores quando comparados ao PB27 e ao CN.

Entretanto, 90 dias após a infecção desafio, exceto o grupo imunizado (PB27), os demais grupos (CP, TRAT, PB27+TRAT e ADJ) apresentaram níveis de expressão gênica menor do que o basal (controle negativo). E no nível protéico (western blot e IHQ), porém, foi possível observar que ambos os grupos imunizados (PB27 e PB27+TRAT), apresentaram níveis de expressão comparáveis ao do controle negativo, enquanto os demais grupos mantiveram os níveis protéicos abaixo do nível basal.

Estudos têm demonstrado que VEGF aumenta a expressão de eNOS pela ativação do receptor tirosina kinase KDR. A inibição da produção de NO por

inibidores de eNOS, inibe significativamente efeitos mitogênicos e angiogênicos induzidos por VEGF. A melhora na função endotelial pela expressão de VEGF, está associada ao aumento da expressão de eNOS e liberação de NO, ou seja, o VEGF desempenha um papel fisiológico na regulação da eNOS, na liberação de NO, e homeostase vascular (Ben-Quan *et. al.*, 1999). Em função disso, foram mensurados os níveis de eNOS pela técnica de PCR em Tempo Real, visto que esta enzima desempenha papel central na manutenção da integridade vascular e é ativada por VEGF (Edirisinghe *et. al.*, 2008; Cerqueira e Yoshida, 2002).

Os resultados obtidos 30 dias após a infecção desafio demonstram que o grupo infectado (CP) apresentou níveis de expressão de eNOS estatisticamente menores que os basais. Em contrapartida, os o grupo imunizado (PB27) apresentou níveis estatisticamente maiores que os demais grupos. Além disso, 90 dias após a infecção desafio, apenas o grupo imunizado apresentou níveis de expressão compatíveis ao basal, os demais grupos apresentaram níveis de expressão inferiores ao mesmo. Resultados estes que nos levam a inferir sobre uma possível tendência da infecção por *P. brasiliensis* interferir ou modular negativamente a expressão desta enzima.

Entretanto, os efeitos de biológicos de VEGF são mediados pela ligação ao receptor específico, expresso em superfície celular. (Ferrara e Davis-Smyth, 1997). Em vista disso, foram detectados os níveis do receptor de VEGF (VEGFR-2) através das técnicas de Imunohistoquímica e RT-PCR. Ambos os resultados aqui apontados nos permitiram avaliar que animais imunizados apresentaram maiores níveis de expressão de VEGFR-2, tanto 30 como 90 dias após a infecção desafio.

A análise conjunta destes resultados suporta a hipótese de que, a infecção por *P. brasiliensis* altera os níveis e a sinalização de VEGF-VEGFR2 pulmonar e conseqüentemente os níveis de eNOS, e portanto, interfere nas funções das células endoteliais, na eficiência do funcionamento e manutenção da homeostase pulmonar, visto que animais infectados por *P. brasiliensis* possuem a expressão diminuída destas moléculas (Voelkel *et. al.*, 2006; Edirisinghe *et. al.*, 2008; Jakkula *et. al.*, 2000). Contudo, a imunização com a

proteína recombinante Pb27 restabelece a expressão de VEGF aos níveis basais, normalizando-a, e aumenta a expressão do receptor VEGFR-2. Assim sendo, a expressão da enzima eNOS e a produção de NO também é restabelecida. Portanto, a imunização com a proteína Pb27r restaura as funções inibidas pela infecção por *P. brasiliensis*, tais como, a manutenção da estrutura do pulmão, processos-chave de migração e proliferação de células endoteliais, além da restituição da barreira sangue-ar em alvéolos e regeneração pulmonar.

Neste trabalho também foram mensurados os níveis de morte celular a partir da detecção de Caspase 3 ativa, com o uso das técnicas de Western Blot e Imunohistoquímica e os resultados obtidos 30 dias após a infecção desafio mostraram que os animais imunizados obtiveram maiores níveis de expressão desta enzima, sendo que, 90 dias após a infecção desafio, o grupo controle Positivo e o adjuvante apresentaram níveis inferiores aos demais grupos, (CN, PB27, TRAT, PB27+TRAT).

A apoptose é um mecanismo de defesa, que é ativado sempre que ocorre uma invasão por agentes patogênicos, ou ainda quando o DNA é lesado. Além disso, a maioria dos tecidos sofre um constante processo de renovação celular graças ao equilíbrio entre proliferação e morte das células. (Grivicich *et. al.*, 2007). Em 2006, Verícimo e colaboradores, apontaram o aumento de apoptose durante o início da infecção por PCM, como um marcador fenotípico de resistência. Os resultados aqui mostrados corroboram com este trabalho, visto que a apoptose foi maior no grupo imunizado (PB27), e o mesmo, apresentou menores níveis de cargas fúngicas, de infiltrados inflamatórios e de lesões pulmonares tais como a fibrose.

Ainda, nossos resultados nos levam a inferir que a enzima caspase 3, é possivelmente inibida em animais infectados nas fases mais tardias de infecção, sendo um provável mecanismo de evasão da célula fúngica, porém, a morte celular é induzida pela imunização nas fases iniciais de infecção e, possivelmente, evita a resposta inflamatória exacerbada, promove a liberação dos fungos intracelulares pela lise das células e matam as vias aéreas desobstruídas através da renovação tecidual.

Estudos sobre o papel do TLRs em paracoccidiodomicose sugerem que leveduras de *P. brasiliensis* utilizam TLR2 e TLR4 como porta de entrada para infectar hospedeiros mamíferos. Como efeito, as leveduras de *P. brasiliensis* parecem ser reconhecidas por TLR2 e TLR4, resultando no aumento capacidade fagocítica, secreção de NO e infecção fúngica de macrófagos. Esse reconhecimento é dependente da sinalização de MYD88 para uma eficiente resposta imune (Loures *et. al.*, 2011; Bonfim *et. al.*, 2009; Calich *et. al.*, 2008b).

Em função disso, foram determinados os níveis de TLR2 e 4 nos grupos experimentais através da técnica de Western Blot. Nossos resultados mostraram de expressão de TLR2 apenas no grupo adjuvante 30 dias após a infecção desafio, e nos grupos tratado e adjuvante, 90 dias após a infecção desafio. Os grupos (CN, CP, PB27, PR27+TRAT), não apresentaram expressão desse receptor em nenhum momento após a infecção desafio. Todavia, quando foram identificados os níveis de TLR4 entre os grupos, foi possível identificar que os grupos imunizados apresentaram maiores níveis de expressão de TLR4, 30 e 90 dias após a infecção desafio. Sendo o grupo apenas infectado (CP) foi aquele que apresentou menores níveis de expressão deste receptor nos dois Pontos de Morte, os resultados de western blot foram ratificados pela Imunohistoquímica.

Em 2007, Ferreira e colaboradores, mostraram que a expressão do gene de TLR2 aumenta depois da infecção em animais suscetíveis, mas não em animais resistentes (Ferreira *et. al.*, 2007). Loures e colaboradores mostraram que TLR2 controla a ativação da imunidade inata e adaptativa contra a infecção por *P. brasiliensis*, e revelaram que TLR2 age como regulador negativo de células Th17, diminuindo sua expansão e ainda como fator que aumenta a patologia pulmonar da PCM devido a reações inflamatórias desenfreadas. (Loures *et. al.*, 2009). Nossos dados concordam com estes estudos, visto que o grupo adjuvante apresentou expressão de TLR2, também mostrou na histologia pulmonar resposta inflamatória exacerbada.

Entretanto, apesar de vários estudos demonstrarem que TLR 4 é o receptor chave no reconhecimento de lipopolissacarídeos bacterianos e que TLR têm

sido implicado na resistência de hospedeiros mamíferos para vários microorganismos, incluindo fungos patogênicos tais como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, e *Cryptococcus neoformans* (Calich *et. al.*, 2008b), em PCM a sinalização deste receptor foi associada à infecção fúngica grave, aumento da resposta inflamatória e expansão prejudicada das células T reguladoras (Loures *et. al.*, 2010).

Os resultados aqui obtidos mostraram maior sinalização deste receptor 30 dias após a infecção desafio em animais imunizados (PB27), sendo que estes animais tiveram resposta inflamatória controlada. Através das análises histológicas foi possível verificar que os animais desse grupo apresentaram vias aéreas desobstruídas e erradicação da carga fúngica. Os demais grupos apresentaram níveis de expressão de TLR4 inferiores ao imunizado, e apresentaram maior quantidade de CFU e resposta inflamatória exacerbada. Ainda, 90 dias após a infecção desafio, todos os grupos que sofreram alguma intervenção (imunização/Fluconazol) aumentaram a expressão deste receptor.

Estes resultados sugerem que a infecção por *P. brasiliensis* apesar de gerar reconhecimento do fungo pelo TLR4, não aumenta os níveis de expressão deste receptor, enquanto a imunização com a proteína Pb27r aumenta e mantém os níveis de expressão durante 90 dias de infecção, sugerindo ser este o mecanismo o qual a resposta imune inata dos animais imunizados foi inicialmente ativada. Estes resultados corroboram com Loures e colaboradores (2011), que sugeriram que *P. brasiliensis* utiliza TLR2 ou TLR4 para entrar em macrófagos e infectar hospedeiros mamíferos, e induzi com isso o reconhecimento da célula fúngica pelo sistema imune, ativando dessa forma a resposta imunológica .

A discussão sobre o perfil de citocinas que leva à proteção em PCM murina é ampla. Vários artigos mostram que a imunoregulação e resistência em PCM está associada a padrões de resposta imune regulada por células T auxiliaadoras do Tipo Th1, enquanto a suscetibilidade está relacionada a respostas tipo Th2 (Calich e Kashino, 1998). Enquanto células Th1 produzem principalmente IFN e IL-2, células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Silva *et. al.*, 1995; Magalhães *et. al.*, 2012). Ainda segundo Tavares e colaboradores

(2012), a infecção por *P. brasiliensis* provoca o acúmulo de mRNA para os genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (Tavares *et. al.*, 2012).

Neste trabalho, foram determinados os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-6, TGF- β e TNF- α) e da enzima iNOS. Os resultados apresentados mostraram que 30 dias após a infecção desafio o grupo controle positivo apresentou níveis significativamente inferiores de TNF, e superiores de IL-4 e IL-6. O grupo adjuvante apresentou níveis superiores das citocinas IL-4, IL-10 e IL-6. Enquanto o grupo imunizado, produziu níveis superiores de INF- γ e TGF- β .

Entretanto, 90 dias após a infecção desafio, todos os grupos apresentaram níveis inferiores de expressão da citocina IL-4, e o grupo controle positivo, além disso, apresentou níveis expressivamente superiores de IL-10 e IL-6. Já o grupo tratado apresentou níveis superiores de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e níveis de expressão compatíveis aos basais da citocina TGF- β . O grupo imunizado (PB27) teve perfil semelhante ao imunizado e tratado (PB27 + TRAT) 90 dias após a infecção desafio, e ambos, além de ter apresentado níveis inferiores de IL-4, apresentaram níveis de expressão compatíveis aos basais (não tiveram diferenças significativas em relação ao controle negativo) em relação à quantificação das demais citocinas dosadas: IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e TGF- β . O grupo adjuvante, 90 dias após a infecção desafio, apresentou níveis superiores de expressão das citocinas IL-10, IL-6, TGF- β e TNF- α e níveis inferiores de IL-4, tendo apresentado níveis normais apenas de IFN- γ .

Ao analisarmos o perfil de citocinas 30 dias após a infecção desafio, podemos sugerir que, na fase inicial da infecção, animais imunizados podem ter apresentado maior proteção em relação aos demais grupos, devido à produção de IFN- γ , enquanto os demais grupos (ADJ e CP) apresentaram na fase inicial de resposta (30 dias) citocinas relacionadas com suscetibilidade em PCM como IL-6, IL-4 e IL-10. Além disso, no início da infecção, o grupo controle positivo apresentou um decréscimo na expressão de TNF- α .

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória produzida por diversas células, sobretudo por macrófagos ativados. Ela estimula o

recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais da infecção e ativa essas células para erradicar o microorganismo (Abbas e Lichtman, 2005).

O TNF- α atua sobre a função macrófaga na PCM humana e experimental, modulando e amplificando a resposta imune, promovendo reação granulomatosa e atividade fungicida mediada por macrófagos. A ausência desta citocina resulta no comprometimento dos mecanismos de defesa associado à incapacidade de desenvolver reações granulomatosas eficientes para conter a multiplicação fúngica. (Fortes *et. al.*, 2011). A suscetibilidade do grupo controle positivo pode estar relacionada com menores níveis de produção de TNF- α dos animais deste grupo na fase inicial da infecção.

O IFN- γ é uma citocina descrita por ser a principal citocina ativadora de macrófagos e exercer funções críticas na imunidade inata e adaptativa, promover a diferenciação de células TCD4⁺ não comprometidas (*naive*) para a sub-população Th1 (Abbas e Lichtman, 2005). IFN- γ pode ativar macrófagos infectados a secretar TNF- α e a inibir a replicação de *P. brasiliensis* (Castaneda *et. al.*, 1988). Cano e colaboradores (1998), mostraram o papel protetor desta citocina na paracoccidiodomicose “a presença de IFN- γ é essencial para a imunidade protetora e para a eliminação de *P. brasiliensis*”.

Estudos reforçam o conceito de que o fenótipo específico de citocinas pode ser o fundamental mecanismo para a regulação ou a continuação do processo fibrótico. Nas fases tardias das respostas inflamatórias, é notado um aumento na produção de determinadas citocinas, capazes de promover o acúmulo de tecido conjuntivo, que resulta em alterações estruturais e funcionais nos tecidos.

De acordo com Elias e colaboradores (1990), células inflamatórias regulam a função dos fibroblastos através da produção de citocinas. Estudos demonstraram que TNF- α , TGF- β , e as interleucinas IL-1, IL-4, IL-6 e IL-8 contribuem para a formação de cicatriz tecidual levando à fibrose, enquanto IFN- γ tem efeito de inibição de fibroblastos e supressão na produção de proteínas matriz extracelular tais como, colágeno e fibronectina (Lukacs *et. al.*, 2001; Elias *et. al.*, 1990). Estes dados podem estar relacionados ao menor

nível de fibrose no pulmão de camundongos imunizados em relação aos demais, visto que, o grupo imunizado (PB27) foi o único que produziu níveis significativos IFN- γ na fase inicial da infecção e não produziu níveis significativos de citocinas indutoras de fibrose tais como, IL-6 e IL-4.

A citocina IL-4 é descrita por estimular o desenvolvimento de células Th2 a partir de células T CD4⁺ *naive* e funciona como fator de crescimento autócrino para células Th2 diferenciadas. A IL-4 antagoniza os efeitos ativadores do IFN- γ sobre os macrófagos, e inibe reações imunes mediadas por células (Abbas e Lichtman, 2005). Estudos mostraram que IL-4 aumenta a gravidade e exacerbação da PCM (Cavassani *et. al.*, 2011; Arruda *et. al.*, 2004). Segundo Pinzan e colaboradores (2010), o perfil de citocinas Th2 que está associado com a produção de IL-4 é produzido por camundongos machos que são suscetíveis á infecção por *P. brasiliensis* e não por fêmeas (Pinzan *et. al.*, 2010). Pina e colaboradores (2006), demonstraram que camundongos deficientes em IL-4, quando infectados por *P. brasiliensis*, apresentavam concentrações pulmonares mais elevadas de IFN- γ e menores das citocinas IL-5 e IL-10 (Pina *et. al.*, 2006).

A análise do perfil de citocinas na fase mais tardia da infecção (90 dias após a infecção desafio) nos permite inferir que animais imunizados apresentaram uma estabilização na resposta imune e seu perfil de citocinas aproximou-se ao basal, exceto para a citocina IL-4, que sofreu decréscimo de expressão. Tais resultados mostram que a resposta imune nestes animais diminuiu e se normalizou, e isto pode ser relacionado aos resultados obtidos na determinação de UFCs e Histologia destes grupos, que demonstraram a ausência de células fúngicas no pulmão, a diminuição da resposta inflamatória, de lesões granulomatosas e de fibrose, ou seja, nos pulmões dos animais imunizados houve redução dos estímulos que induzissem a atividade da resposta imune celular.

Contudo, nos demais grupos (CP, TRAT, ADJ), 90 dias após a infecção desafio, apesar do decréscimo de IL-4, a expressão das citocinas com perfil indutor de suscetibilidade IL-6 e IL-10 foi elevada. Entre esses grupos, é interessante ressaltar que a resposta imune gerada pelo ADJ apresentou

produção elevada de quase todas citocinas aqui dosadas, excetuando apenas o IFN- γ . O grupo tratado, que apesar de expressar níveis superiores de citocinas que induzem suscetibilidade também expressou de citocinas níveis altos de citocinas relacionadas à resistência. A ausência de uma resposta imune direcionada pode ter gerado a suscetibilidade destes animais. Esses resultados também corroboram com aqueles vistos na determinação de UFCs e Histologia, em que animais que apresentaram maior produção de IL-6 e IL-10 foram mais suscetíveis à infecção por *P. brasiliensis* e apresentaram um perfil histológico com presença de células fúngicas, granulomas e fibrose pulmonar.

A IL-10 é uma citocina inibidora de macrófagos e está, portanto, envolvida no controle das reações da imunidade inata e da imunidade mediada por células, inibe a produção de IL-12, e conseqüentemente, a secreção de IFN (Abbas e Lichtman, 2005). Em PCM, a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 em linfonodos de pacientes com a forma aguda da doença, está associada ao mecanismo pelo qual o fungo evade da resposta imune do hospedeiro, contribuindo para a forma disseminada da PCM. A detecção de IL-10 e IL-5 por imunomarcção em granulomas frouxos indica que estas citocinas induzem uma resposta imune ineficaz para conter a infecção fúngica (Fortes *et. al.*, 2011). Estudos mostram que a secreção da citocina IL-10 está relacionada com a suscetibilidade em PCM (Pinzan *et. al.*, 2010; Ferreira *et. al.*, 2007).

A IL-6 é uma citocina sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais, fibroblastos, entre outras. O TNF- α atua ainda como indutor fisiológico na síntese e secreção de IL-6 por diversas células em resposta a um estímulo ou em resposta a microrganismos. A IL-6 possui, entre outras, a função de induzir a síntese de proteínas de fase aguda, contribuindo assim para os efeitos sistêmicos da inflamação, estimulando a produção de neutrófilos e o crescimento de linfócitos B.

A presença de citocinas com atividade potencialmente imunossupressora tais como, IL-6 e IL-10, em fases iniciais da infecção por *M. avium*, foram relatadas como causa provável de resposta imune inadequada contra o microrganismo (Denis, 1990). Além disso, IL-6 e IL-10 têm sido demonstradas por mediar a

resposta imune e também por serem responsáveis pela imunopatogênese de micoses sistêmicas, como a coccidioidomicose (Dooley *et. al.*, 1994).

Em PCM a citocina IL-6 foi descrita possuir um efeito autócrino sobre os monócitos, no sentido de modular negativamente a função dessas células, é provável que a produção de IL-6 seja induzida por cepas virulentas de *P. brasiliensis*, e possa impedir a ativação de monócitos e macrófagos adjacentes ao local infectado, diminuindo a atividade fungicida dessas células e talvez, propiciando a sobrevivência do patógeno (Siqueira, 2009; Siqueira *et. al.*, 2009).

Nossos resultados concordam com o que foi descrito sobre as citocinas IL-10 e IL-6, visto que, os animais mais acometidos e suscetíveis à infecção obtiveram níveis superiores de expressão destas interleucinas.

O TGF- β , inibe a diferenciação de células T e a ativação de macrófagos, inibindo as respostas imunes e inflamatórias (Abbas e Lichtman, 2005). Em PCM, esta citocina já foi descrita por estar relacionada com fibrose e com as formas mucocutâneas. A presença de TGF- β nas áreas de fibrose sugere que esta citocina está envolvida no processo de cicatrização através da estimulação da proliferação de fibroblastos, como também, em funções reparadoras e reguladoras das lesões, modulando a resposta inflamatória, reduzindo a destruição tecidual e contribuindo para o reparo e menor intensidade de sequela tecidual (Parise-Fortes *et. al.*, 2006; Nishikaku e Burger, 2003). Os resultados aqui apresentados mostram a produção de TGF- β pelos grupos imunizados na fase inicial da infecção, porém na fase mais tardia (90 dias) somente o grupo adjuvante apresentou altos níveis de expressão desta citocina. Os mecanismos que levam TGF- β a induzir fibrose pulmonar, ainda são desconhecidos, e, em nosso trabalho, não foi possível correlacionar a presença desta citocina com a formação de fibrose pulmonar.

O desequilíbrio na produção tanto de citocinas supressoras como estimuladoras pode afetar a resposta inata ou ainda causar distúrbios na resposta imune específica mediada por linfócitos T e B (Bozzi *et. al.*, 2009). Os resultados aqui mostrados apontam o potencial da proteína Pb27r na

modulação da resposta imune e inflamatória induzida pela imunização contra PCM, diminuindo assim, a carga fúngica, tempo de tratamento, gastos governamentais com tratamento, a extensão das lesões e prevenindo recidivas.

Foram mensurados também, os níveis da enzima Óxido nítrico Sintase Induzível (iNOS). A isoforma II ou óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) é uma NOS induzida por citocinas e lipopolissacarídeos, no endotélio e musculatura lisa vascular. Essa enzima produz grande quantidade de NO, que tem efeito citostático na inibição de enzimas contendo ferro, causa fragmentação de DNA e atua em parasitas e células tumorais (Cerqueira e Yoshida, 2002). A iNOS epitelial bronquial é responsável pela defesa imunológica a agentes externos inalados, principalmente pelo recrutamento de macrófagos epiteliais e subepiteliais (Filho e Zilberstein, 2000).

Os resultados aqui mostrados, apontaram para maiores níveis de iNOS no grupo adjuvante, tanto em 30 como em 90 dias após a infecção desafio, sendo que em 90 dias, o grupo tratado também apresentou níveis superiores de iNOS. Estes grupos, entre os grupos estudados, foram os que apresentaram maiores níveis de fibrose pulmonar, formação granulomatosa e suscetibilidade, além disso, o grupo tratado foi o único que apresentou, além do controle positivo, presença de células fúngicas na determinação de UFCs 90 dias após a infecção desafio.

A enzima iNOS tem sido descrita por determinar resistência em PCM. Animais com produção deficiente desta enzima possuem exacerbação da resposta inflamatória e alta produção de citocinas Th1 e Th2 durante a infecção por *P. brasiliensis* (Livonesi *et. al.*, 2009; Batista *et. al.*, 2005). A molécula antimicrobiana chave envolvida na morte de patógenos intracelulares é o NO, o qual é gerado a partir do aminoácido L-arginina pela isoforma induzível da sintase do NO (iNOS ou NOS2) (Nascimento *et. al.*, 2002). O NO atua tanto como mensageiro intracelular, como faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida e possui ação antibactericida, antiparasítica e antiviral, sendo tóxico aos microorganismos invasores.

Porém, existe um delicado limite de concentração tissular de NO que define a não-toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para ação antimicrobica (Filho e Zilberstein, 2000). Estudos tem mostrado a outra face na produção de óxido nítrico pela enzima iNOS. Nascimento e colaboradores (2002) mostraram o papel dúbio desta enzima na infecção por *P. brasiliensis*, e observaram que as respostas dos macrófagos são geneticamente determinadas e que padrões distintos de respostas fenotípicas, principalmente relacionadas com a produção de NO, são estabelecidas durante a infecção. Além disso, descreveram que embora a atividade do NO derivado de iNOS seja crítica para o controle da multiplicação de fungos em animais susceptíveis e resistentes, a alta e persistente produção de NO é marca de suscetibilidade.

Estes dados estão associados com a idéia de que NO pode exercer efeitos positivos e negativos sobre a regulamentação da defesa do hospedeiro (Connelly *et. al.*, 2001). Descobertas sugerem que o NO tem um papel importante na modulação negativa da resposta inflamatória, por induzir a formação de granulomas soltos e a disseminação do fungo, resultando, em fases posteriores, na progressão da paracoccidiodomicose (Nishikaku *et. al.*, 2009). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os estudos aqui mostrados, visto que, animais suscetíveis obtiveram níveis estatisticamente superiores de expressão de iNOS. O que nos faz concordar que existe a necessidade da produção de NO, na defesa e resistência contra PCM, (Livonesi *et. al.*, 2009), mas a ausência ou altos níveis desta enzima, pólos extremos de expressão, estão relacionados à suscetibilidade. Sugerimos aqui, que um equilíbrio na expressão desta enzima pode ser o essencial na defesa contra *P. brasiliensis* e este equilíbrio foi observado em animais imunizados (PB27 e Pb27+TRAT), que inicialmente tiveram uma tendência em aumentar a produção de iNOS, mas 90 dias após a infecção desafio já haviam normalizado a expressão dessa enzima.

A resposta imune humoral também foi avaliada. A imunização com a proteína Pb27r antes da infecção desafio, induziu a produção de altos níveis de IgG nos animais imunizados. Estes níveis foram determinados também após a infecção desafio, e foram persistentemente maiores nos animais imunizados durante o período de infecção (até 90 dias). Em função disso, também foram mensuradas

as subclasses de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) induzidas pela imunização. Foi possível observar que a imunização só não ativou a expressão de maiores níveis de expressão do subtipo IgG3, sendo que os outros: IgG1, IgG2a e IgG2b foram expressos em níveis significativamente maiores durante o período de imunização. O subtipo IgG1, foi o que obteve maior nível de expressão. Este perfil de resposta humoral foi observado por Fernandes e colaboradores (2011) na utilização da proteína Pb27r como vacina terapêutica e por Santose colaboradores (2012), na análise do perfil de IgG em humanos frente à Pb27r

Após a infecção, foram determinados novamente os níveis das subclasses de IgG, para determinação de quais subclasses estavam relacionadas com a proteção contra *P. brasiliensis*. E foi possível observar que 30 dias após a infecção desafio os animais imunizados produziram níveis significativos de todas as subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3). Entretanto, 90 dias após a infecção desafio este perfil se modificou, apenas os níveis de IgG1 permaneceram mais altos nos animais imunizados, tendo os demais subtipos (IgG2a, IgG2b e IgG3) apresentado níveis comparativos ao controle negativo.

Porém, é interessante ressaltar que o grupo controle positivo apresentou níveis de expressão das subclasses IgG2a e IgG2b inferiores ao controle negativo, ou seja, nesses animais houve uma expressão estaticamente inferior à normal destas subclasses de Ig. O mesmo aconteceu com o grupo tratado em relação ao IgG2b. Ainda, 90 dias após a infecção desafio, não houve diferença estatística de expressão de IgG3 entre os grupos.

O papel de anticorpos na PCM ainda não foi totalmente estabelecido e a resposta imune humoral é descrita por não ter, aparentemente, um papel central na defesa contra PCM. Porém, pacientes com PCM e animais infectados por *P. brasiliensis* produzem grandes quantidades de anticorpos.

Inicialmente, grandes títulos de anticorpos foram associados à gravidade da doença, porém, segundo Negro e colaboradores (2000), a correlação entre a gravidade da doença e altos títulos sorológicos é comumente referida na literatura, mas não foi evidenciada. Cano e colaboradores (1995) mostraram a relação entre subclasses de anticorpos e resistência à PCM, e a relação destes

anticorpos com as respostas imunes Th1 e Th2. Com este estudo, esses autores observaram que camundongos resistentes produzem títulos significativamente mais altos de IgG2a e IgG3 quando comparados com suscetíveis e sugeriram a influência de diferentes citocinas sobre a produção de anticorpos e de seus isotipos. O IFN- γ foi descrito por ser o principal indutor da secreção IgG2a, enquanto que IL-4 foi a associada com isotipo IgG1. Assim, sugerindo que uma resposta Th2 pode ser dominante em animais suscetíveis e uma resposta Th1 influencia a resistência (Cano *et. al.*, 1995; Magalhães *et. al.*, 2012).

Altos níveis de subtipos de IgG são diferentes em diferentes estados clínicos da PCM. Na forma juvenil, a resposta tipo Th2 é dominante e é também responsável por alta severidade da doença e descontrole da carga fúngica e disseminação. Na forma adulta, descrita por gerar resposta Th1, altos níveis de IFN levam à produção de IgG2, conferindo resistência (Baida *et. al.*, 1999). Autores sugerem que, em PCM, a resposta com anticorpos pode variar de acordo com as formas clínicas e talvez com a gravidade da doença. Soros da forma crônica possuem altos níveis de anticorpos específicos, principalmente a subclasse IgG1. Assim, a ativação de células B, no início da infecção pode influenciar o desenvolvimento de células T auxiliares (*helper*), desempenhar um papel nos sítios alveolares e influenciar a polarização das células T na fase precoce da infecção (Unterkircher *et. al.*, 2004).

Em PCM, apesar de não ser bem descrito, estudos têm demonstrado que os anticorpos podem constituir um importante mecanismo de defesa. Camundongos com baixa produção de anticorpos e infectados por *P. brasiliensis* obtiveram altas taxas de mortalidade e disseminação fúngica (Fernandes, 2011).

Ainda, o estudo sobre a expressão de anticorpos direcionados durante o curso do tratamento contra PCM, mostrou que antígenos de *P. brasiliensis* induzem uma resposta primária de IgM e subsequentemente uma resposta IgG1. Pacientes que começaram o tratamento antifúngico e desenvolveram uma melhor resposta imune contra o *P. brasiliensis*, tiveram os títulos de IgG1 aumentados (Bertini *et. al.*, 2007).

Segundo, Suzukie colaboradores (1997) IgG1 pode ter um papel importante na resolução da infecção fúngica. O fungo revestido com IgG1 pode ligar-se especificamente aos receptores Fc nas superfícies de fagócitos (monócitos e neutrófilos), e estes removem patógenos e seus produtos de degradação dos espaços extracelulares. Além disso, as células NK têm a capacidade de destruir as células revestidas com anticorpo alvo através do citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos, que pode ser desencadeada pela interação entre IgG1 na superfície de levedura e o RIII Fc (CD16), expresso em células NK. Este receptor reconhece anticorpos IgG1 e IgG3 e está envolvido na liberação de perforina e granzimas de grânulos citoplasmáticos (Nabavi, 1986; Abbas e Lichtman, 2005; Bertini *et. al.*, 2007).

Xander e colaboradores (2007) indicaram que a imunidade mediada por anticorpos pode contribuir para o controle da infecção, e mostraram que o anticorpo que reconhecia a proteína secretada de 75-kDa inibiu o crescimento de *P. brasiliensis in vitro* e reduziu o número de UFCs no pulmão *in vivo* (Xander, 2007).

Os resultados aqui mostrados corroboram com estudos que relacionam produção de anticorpos à defesa do organismo contra PCM, visto que, a imunização que teve efeito protetor em PCM induziu a expressão de altos títulos de anticorpo, principalmente na fase inicial de infecção. Entre os mecanismos que anticorpos podem ter contra a PCM estão, a neutralização de microrganismos e toxinas microbianas, a opsonização de antígenos para fagocitose por macrófagos e neutrófilos, a ativação da via clássica do complemento, citotoxicidade mediada por células (NK e macrófagos) dependente de anticorpos e inibição da ativação de células B por realimentação (*feedback*) (Abbas & Lichtman, 2005).

Ainda, nossos resultados corroboram com outros estudos feitos com Pb27r tanto em humanos quanto em animais, que mostraram a produção de altos níveis de IgG, quando Pb27r é utilizada como o antígeno em ensaios de ELISA (Santos *et. al.*, 2012; Fernandes, 2011; Fernandes *et. al.*, 2011b).

Segundo, Santos e colaboradores (2012) com o estudo feito em humanos, os títulos de IgG total tiveram alta reatividade frente a Pb27r , sendo os subtipos IgG1, IgG4, IgG2, respectivamente, os mais reativos. Somente a análise de IgG3 não apresentou diferença significativa entre os pacientes com PCM e os de grupos controle negativo (Santos *et. al.*, 2012). Resultados estes, compatíveis com os obtidos neste trabalho. A detecção de altos títulos de IgG durante todo período de infecção e das subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 nas fases iniciais de infecção em animais imunizados, nos permite sugerir que a produção de anticorpos é essencial na defesa do organismo e possível mecanismo de proteção da imunização com Pb27r.

VII. CONCLUSÃO

Este trabalho permite concluir que a imunização com a Pb27r altera e modula a resposta inflamatória nos animais diminuindo o influxo de células para o pulmão e reduzindo os níveis de fibrose pulmonar.

Durante a infecção há o reconhecimento do fungo pelas células via TLR4 e a imunização aumenta a expressão deste receptor na fase inicial da infecção, possível mecanismo de resistência em animais imunizados. A infecção por *P. brasiliensis* favorece a produção das citocinas IL-10 e IL-6 e inibe a morte celular via Caspase 3, sendo estes possíveis mecanismos de evasão da célula fúngica relacionados com a suscetibilidade em PCM. Todavia, a imunização impede a produção dessas citocinas e induz a expressão da enzima caspase 3 ativa durante a infecção, o que pode evitar a resposta inflamatória exacerbada, promover a liberação dos fungos intracelulares e desobstruir as vias aéreas, resposta que pode ser associada à proteção encontrada nestes animais. Ainda, é factível concluir que a infecção por *P. brasiliensis* diminui a expressão de VEGF, VEGFR2 e da enzima eNOS no pulmão, interferindo na vascularização, na migração e proliferação de células endoteliais e na restituição da barreira sangue-ar em alvéolos. Entretanto, a imunização com a Pb27r restabelece os níveis de VEGF e VEGFR2 e da enzima eNOS no pulmão.

Por fim, conclui-se que a Pb27r age modulando positivamente os mecanismos de resposta inflamatória, e conseqüentemente, induz proteção em indivíduos imunizados. Além de ter a capacidade de incutir maior proteção, restabelece a homeostase pulmonar, influencia ativamente na vascularização e na produção de óxido nítrico alterados pela infecção. O entendimento dos mecanismos de atuação da proteína devem ser melhor estudados, para que esta possa ser utilizada em aplicações futuras contra PCM. O tratamento com o quimioterápico Fluconazol mostrou-se ineficaz na eliminação de UFCs e na inibição da reação inflamatória exacerbada e possivelmente favorece a formação de fibrose pulmonar. A associação da proteína com o quimioterápico Fluconazol, apesar de eficiente, não se faz necessária, visto que, a imunização por si só, apresentou melhores resultados contra infecção por *P. brasiliensis*.

VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Obter estudos mais aprofundados sobre a resposta inflamatória gerada pela imunização com a proteína Pb27r.
2. Determinar o(s) epítipo(s) desta proteína que são capazes de estimular resposta imunológica e modular positivamente a resposta inflamatória.
3. Verificar a proteção desta proteína contra a cepa de *P. brasiliensis* PB01.
4. Comparar a resposta inflamatória gerada por esta proteína contra a Cepa virulenta PB18 com a resposta inflamatória gerada por esta proteína contra PB01.

IX. ANEXO I – APROVAÇÃO DO CETEA



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 203/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Estudo da resposta inflamatória em pulmões de camundongos imunizados com PB27R submetidos à infecção desafio por Paracoccidioides Brasiliensis**", que tem como responsável(is) **Alfredo Miranda de Góes**, está(ão) 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 **1/12/2010**.

Este certificado expira-se em **1/12/2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 203/2010**, related to the project entitled "**Study of the inflammatory response in lungs of mice immunized with PB27R submitted to the challenge infection by Paracoccidioides Brasiliensis**", under the supervisors of **Alfredo Miranda de Góes**, 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 1, 2010**.

This certificate expires in **December 1, 2015**.

Belo Horizonte, 3 de Dezembro de 2010.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora 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
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@proc.ufmg.br

(Mod.Cert v1.0)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadie, Y., F. Bregeon, L. Papazian, F. Lange, B. Chailley-Heu, P. Thomas, P. Duvaldestin, S. Adnot, B. Maitre, and C. Delclaux, (2005). Decreased VEGF concentration in lung tissue and vascular injury during ARDS. *European Respiratory Journal*, v. 25, p. 139-46.
- Abbas, A. K., and A. H. Lichtman, (2005). *Imunologia Celular e Molecular: Rio de Janeiro/Brasil*, Elsevier .
- Akira, S., (2011), Innate immunity and adjuvants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. V. 366, 2748–2755.
- Alves, C. C., A. L. Azevedo, M. F. Rodrigues, R. P. Machado, M. A. Souza, M. A. Machado, H. C. Teixeira, and A. P. Ferreira, (2009), Cellular and humoral immune responses during intrathoracic paracoccidioidomycosis in BALB/c mice: *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 32, p. 513-25.
- Alberts, B. *et. al.* *Molecular Biology of the cell*. 3ª ed. New York: Garland.
- Ameen, M., C. Talhari, and S. Talhari, (2009). Advances in paracoccidioidomycosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 35, p. 576-80.
- Andrade, Z., A., (2005), Regressão da fibrose hepática. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol.38.
- Anis, M. M., S. A. Fulton, S. M. Reba, Y. Liu, C. V. Harding, and W. H. Boom, (2008), Modulation of pulmonary dendritic cell function during mycobacterial infection, *Infect Immun*, v. 76, p. 671-7.
- Arruda, C., R. C. Valente-Ferreira, A. Pina, S. S. Kashino, R. A. Fazioli, C. A. Vaz, M. F. Franco, A. C. Keller, and V. L. Calich, (2004), Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern: *Infect Immun*, v. 72, p. 3932-40.

- Azevedo-Pereira, J. M., and Q. Santos-Costa, (2008), Os receptores das quimiocinas e a sua importância no ciclo replicativo do vírus da imunodeficiência humana, *Acta Medica Portuguesa*.
- Bagagli, E., A. Sano, K. I. Coelho, S. Alquati, M. Miyaji, Z. P. de Camargo, G. M. Gomes, M. Franco, and M. R. Montenegro, (1998), Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 58, p. 505-12.
- Bagagli, E., R. C. Theodoro, S. M. Bosco, and J. G. McEwen, (2008), *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia*, v. 165, p. 197-207.
- Baida, H., P. J. Biselli, M. Juvenale, G. M. Del Negro, M. J. Mendes-Giannini, A. J. Duarte, and G. Benard, (1999), Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*, v. 1, p. 273-8.
- Batista, A. C., C. T. Soares, and V. S. Lara, (2005), Failure of nitric oxide production by macrophages and decrease in CD4⁺ t cells in oral paracoccidioidomycosis: possible mechanisms that permit local fungal multiplication. *Rev. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*.
- Beauvillain, C., P. Cunin, A. Doni, M. Scotet, S. Jaillon, M.-L. Loiry, G. Magistrelli, K. Masternak, A. Chevailler, Y. Delneste, and P. Jeannin, 2011, CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood*.
- Benard, G., C. C. Romano, C. R. Cacere, M. Juvenale, M. J. Mendes-Giannini, and A. J. Duarte, (2001), Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis: *Cytokine*. V. 13, p. 248-52.
- Ben-Quan, S., David Y. Lee, and h. F. Zioncheck, (1999), Vascular Endothelial Growth Factor Governs Endothelial Nitric-oxide Synthase Expression via

a KDR/Flk-1 receptor and a Protein Kinase C Signaling Pathway: The Journal Of Biological Chemistry.

Bertini, S., A. L. Colombo, H. K. Takahashi, and A. H. Straus, (2007), Expression of antibodies directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of paracoccidioidomycosis treatment, Clin Vaccine Immunol, v. 14, p. 150-6.

Bethlem, E. P., D. Capone, B. Maranhao, C. R. Carvalho, and B. Wanke, (1999), Paracoccidioidomycosis: Curr Opin Pulm Med, v. 5, p. 319-25.

Bilate, A. M. B., (2007), Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas: Temas De Reumatologia Clínica v. 8.

Bird, I. M., (2011). Endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide function: new light through old windows Journal of Endocrinology.

Blotta, M. H., R. L. Mamoni, S. J. Oliveira, S. A. Nouer, P. M. Papaiordanou, A. Goveia, and Z. P. Camargo, (1999). Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region: Am J Trop Med Hyg, v. 61, p. 390-4.

Boatright, K. M., and G. S. Salvesen, 2003, Mechanisms of caspase activation. Current Opinion in Cell Biology

Bonfim, C. V., R. L. Mamoni, and M. H. Blotta, (2009). TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*: Med Mycol, v. 47, p. 722-33.

Bozzi, A., P. P. Pereira, B. S. Reis, M. I. Goulart, M. C. Pereira, E. P. Pedroso, M. F. Leite, and A. M. Goes, (2006), Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphism frequency in paracoccidioidomycosis: Hum Immunol, v. 67, p. 931-9.

Bozzi, A., B. S. Reis, M. I. Goulart, M. C. Pereira, E. P. Pedroso, and A. M. Goes, (2007), Analysis of memory T cells in the human

paracoccidioidomycosis before and during chemotherapy treatment: Immunol Lett, v. 114, p. 23-30.

Bozzi, A., B. S. Reis, P. P. Pereira, E. P. Pedroso, and A. M. Goes, (2009), Interferon-gamma and interleukin-4 single nucleotide gene polymorphisms in Paracoccidioidomycosis. Cytokine, v. 48, p. 212-7.

Bozzi, A., B. S. Reis, F. L. Prado, E. P. Pedroso, M. F. Leite, and A. M. Goes, (2004), Modulation of CD28 and CD86 expression in patients with paracoccidioidomycosis in different periods of treatment: Scand Journal Immunol, v. 60, p. 500-5.

Bradford, M. M., (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem

Brummer, E., E. Castaneda, and A. Restrepo, (1993), Paracoccidioidomycosis: an update: Clin Microbiol Rev, v. 6, p. 89-117.

Bueno, J. P., M. J. Mendes-Giannini, G. M. Del Negro, C. M. Assis, C. K. Takiguti, and M. A. Shikanai-Yasuda, (1997), IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation: J Med Vet Mycol, v. 35, p. 213-7.

Cacere, C. R., C. C. Romano, M. J. Mendes Giannini, A. J. Duarte, and G. Benard, (2002), The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. Clin Immunol, v. 105, p. 215-22.

Calich, V. L., T. A. da Costa, M. Felonato, C. Arruda, S. Bernardino, F. V. Loures, L. R. Ribeiro, R. de Cassia Valente-Ferreira, and A. Pina, (2008), Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Mycopathologia, v. 165, p. 223-36.

- Calich, V. L., and S. S. Kashino, (1998), Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Braz J Med Biol Res, v. 31, p. 615-23.
- a) Calich, V. L., A. Pina, M. Felonato, S. Bernardino, T. A. Costa, and F. V. Loures, (2008), Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis: FEMS Immunol Med Microbiol, v. 53, p. 1-7.
- b) Calich, V. L., C. A. Vaz, and E. Burger, (2008), Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection: Res Immunol, v. 149, p. 407-17; discussion 499-500.
- Calvi, S. A., A. M. Soares, M. T. Peracoli, M. Franco, R. L. Ruiz, Jr., J. Marcondes-Machado, D. Fecchio, M. C. Mattos, and R. P. Mendes, (2003), Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes: Microbes Infect, v. 5, p. 1373-9.
- Camargo, Z. P., and M. F. Franco, (2000). Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis: Rev Iberoam Micol, v. 17, p. 41-8.
- Camargo, Z. P. d. (2008). Serology of paracoccidioidomycosis: Mycopathologia, v. 165, p. 289-302.
- Campos, E. G., R. S. Jesuino, S. Dantas Ada, M. Brigido Mde, and M. S. Felipe, (2005), Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*: Genet Mol Res, v. 4, p. 409-29.
- Cano, L. E., S. S. Kashino, C. Arruda, D. Andre, C. F. Xidieh, L. M. Singer-Vermes, C. A. Vaz, E. Burger, and V. L. Calich, (1998), Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis: Infect Immun, v. 66, p. 800-6.

- Cano, L. E., L. M. Singer-Vermes, C. A. Vaz, M. Russo, and V. L. Calich, (1995), 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. 1777-83.
- Castaneda, E., E. Brummer, D. Pappagianis, and D. A. Stevens, (1988), Impairment of cellular but not humoral immune responses in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice: *Infect Immun*, v. 56, p. 1771-7.
- Cavassani, K. A., F. S. Tristao, L. L. Oliveira, F. A. Rocha, J. O. Vancim, A. P. Moreira, A. P. Campanelli, L. A. Panagio, C. M. Milanezi, R. Martinez, M. A. Rossi, and J. S. Silva, (2011), Cell-free antigens from *Paracoccidioides brasiliensis* drive IL-4 production and increase the severity of paracoccidioidomycosis: *PLoS One*, v. 6, p. e21423.
- Cerqueira, N. F., and W. B. Yoshida, (2002). ÓXIDO NÍTRICO. REVISÃO: *Acta Cirúrgica Brasileira* - v. 17.
- Chiarella, A. P., C. Arruda, A. Pina, T. A. Costa, R. C. Ferreira, and V. L. Calich, (2007). The relative importance of CD4⁺ and CD8⁺T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis: *Microbes Infect*, v. 9, p. 1078-88.
- Choi, E. S., Pierce E. M, Jakubzick C, Carpenter K.J,*et. al* (2006), Focal interstitial CC chemokine receptor 7 (CCR7) expression in idiopathic interstitial pneumonia: *J Clin Pathol*.
- Cisalpino, P. S., Puccia, R., Yamauchi, L.M., Cano, M.I., da Silveira, J.F. e, and L. R. Travassos, (1996), Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*.: *J Biol Chem*
- Cock, A. M., L. E. Cano, D. Velez, B. H. Aristizabal, J. Trujillo, and A. Restrepo, (2000), Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-

viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules: Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 42, p. 59-66.

Cohen, G. M., (1997), Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem. J.

Colobran, R., R. Pujol-Borrell, M. P. Armengol, and M. Juan, (2007), The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity: Clin Exp Immunol, v. 148, p. 208-17.

Connelly, L., M. Palacios-Callender, C. Ameixa, S. Moncada, and A. J. Hobbs., (2001), Biphasic regulation of NF-KB activity underlies the pro- and antiinflammatory actions of nitric oxide. : J. Immunol.

Correa, M. M., A. M. Bedoya, M. P. Guerrero, J. Mendez, A. Restrepo, and J. G. McEwen, (2006), Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein: Mycoses, v. 50, p. 41-7.

Coutinho, Z. F., D. Silva, M. Lazera, V. Petri, R. M. Oliveira, P. C. Sabroza, and B. Wanke, (2002), Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995): Cad Saude Publica, v. 18, p. 1441-54.

Cross, M. J., and e. Claesson-Welsh, (2001) FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. Pharmacological Sciences v. Vol.22 No.4.

Dantas, A. S., R. V. Andrade, M. J. de Carvalho, M. S. Felipe, and E. G. Campos, (2008), Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*: assessing catalase and cytochrome c peroxidase: Mycol Res, v. 112, p. 747-56.

Denis, M., and G. E.O, (1990), Recombinant tumour necrosis factor-alpha decreases whereas recombinant interleukin-6 increases growth of a virulent strain of Mycobacterium avium in human macrophages. ; : Immunology

- Dias, M. F., A. L. Figueira, and W. de Souza, (2004), A morphological and cytochemical study of the interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and neutrophils: *Microsc Microanal*, v. 10, p. 215-23.
- Diniz, S. N., B. S. Reis, T. S. Goes, C. S. Zouain, M. F. Leite, and A. M. Goes, (2004), Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*: *Vaccine*, v. 22, p. 485-92.
- Martins, E. M.N, B. S. Reis, V. C. Fernandes, M. M. Costa, A. M. Goes, and A. S. de Andrade, (2007), Immunization with radioattenuated yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* induces a long lasting protection in BALB/c mice: *Vaccine*, v. 25, p. 7893-9.
- Dooley, D. P., R. A. Cox, K. L. Hestilow, M. J. Dolan, D. M. Magee, (1994). Cytokine induction in human coccidioidomycosis: *Infect. Immun.*
- Edirisinghe, I., S. R. Yang, H. Yao, S. Rajendrasozhan, S. Caito, D. Adenuga, C. Wong, A. Rahman, R. P. Phipps, Z. G. Jin, and I. Rahman (2008), VEGFR-2 inhibition augments cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction: *Faseb J*, v. 22, p. 2297-310.
- Elias, J. A., B. Freundlich, J. A. Kern, and J. Rosenbloom., (1990), Cytokine Networks in the Regulation of Inflammation and Fibrosis in the Lung*. *CHEST*.
- Fernandes, V. C., (2011), Estudo das proteínas pb40r e pb27r de *Paracoccidioides brasiliensis* na terapia e no Imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- a) Fernandes, V. C., J. B. Coitinho, J. M. Veloso, S. A. Araujo, E. P. Pedroso, and A. M. Goes, (2011), Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis: *J Immunol Methods*, v. 367, p. 78-84.

b) Fernandes, V. C., E. M. Martins, J. N. Boeloni, J. B. Coitinho, R. Serakides, and A. M. Goes, (2011), Additive effect of rPb27 immunization and chemotherapy in experimental paracoccidioidomycosis: PLoS One, v. 6, p. e17885.

c) Fernandes, V. C., E. M. Martins, J. N. Boeloni, J. B. Coitinho, R. Serakides, and A. M. Goes, (2011), The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis: Microbes Infect, v. 13, p. 1062-72.

Fernandes V. C, Martins E. M, Boeloni J. N, Serakides R, Goes A.M.,(2012), Protective Effect of rPb40 as an Adjuvant for Chemotherapy in Experimental Paracoccidioidomycosis. Mycopathologia.

Ferrara, N., and T. Davis-Smyth, (1997), The biology of vascular endothelial growth factor: Endocr Rev, v. 18, p. 4-25.

Ferreira, K. S., K. R. Bastos, M. Russo, and S. R. Almeida, (2007), Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and Pulmonary Dendritic Cells Induces Interleukin-10 Production and Toll-Like receptor-2 Expression: Possible Mechanisms of Susceptibility: JID

Ferreira, K. S., A. Q. Maranhao, M. C. Garcia, M. M. Brigido, S. S. Santos, J. D. Lopes, and S. R. Almeida, Dendritic cells transfected with scFv from Mab 7.B12 mimicking original antigen gp43 induces protection against experimental Paracoccidioidomycosis: PLoS One, v. 6, p. e15935.

FILHO, R. F., and B. ZILBERSTEIN, (2000), Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções.: Rev Ass Med Brasil.

Fornazim, M. C., A. Balthazar, R. Quagliato, Jr., R. L. Mamoni, C. Garcia, and M. H. Blotta, (2003), Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis: Eur Respir J, v. 22, p. 895-9.

- Fortes, M. R., H. A. Miot, C. S. Kurokawa, M. E. Marques, and S. A. Marques, (2011), Immunology of paracoccidioidomycosis: An Bras Dermatol, v. 86, p. 516-24.
- Franco, L., L. Najvar, B. L. Gomez, S. Restrepo, J. R. Graybill, and A. Restrepo, (1998), Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses: Am J Trop Med Hyg, v. 58, p. 424-30.
- Freitas, R. M., R. Prado, F. L. Prado, I. B. Paula, M. T. Figueiredo, C. S. Ferreira, E. M. Goulart, and E. R. Pedroso, Pulmonary paracoccidioidomycosis: radiology and clinical-epidemiological evaluation: Rev Soc Bras Med Trop, v. 43, p. 651-6.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. e Mathieu, C. Ameixa . (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression: Methods
- Gonzalez, A., W. de Gregori, D. Velez, A. Restrepo, and L. E. Cano (2000), Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: Infect Immun, v. 68, p. 2546-52.
- Gonzalez, A., A. Restrepo, and L. E. Cano (2007). Role of iron in the nitric oxide-mediated fungicidal mechanism of IFN-gamma-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 49, p. 11-6.
- Gonzalez, A., A. Restrepo, and L. E. Cano, (2008), Pulmonary immune responses induced in BALB/c mice by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: Mycopathologia, v. 165, p. 313-30.
- Gonzalez, A., J. H. Sahaza, B. L. Ortiz, A. Restrepo, and L. E. Cano, (2003). Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection: Med Mycol, v. 41, p. 391-9.

- Gonzalez, A., A. Yanez, D. Gozalbo, and M. L. Gil, (2008), MyD88 is dispensable for resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in a murine model of blood-borne disseminated infection: FEMS Immunol Med Microbiol, v. 54, p. 365-74.
- Grivicich, I., A. Regner, and A. B. d. Rocha, (2007), Apoptosis: Programmed Cell Death: Revista Brasileira de Cancerologia
- Hato, T., Y. Kimura, T. Morisada, G. Y. Koh, K. Miyata, M. Tabata, T. Kadomatsu, M. Endo, T. Urano, F. Arai, K. Araki, T. Suda, K. Kobayashi, and Y. Oike, (2009). Angiopoietins contribute to lung development by regulating pulmonary vascular network formation: Biochem Biophys Res Commun, v. 381, p. 218-23.
- Hengartner, M. O., (2000). The biochemistry of apoptosis. NATURE, v. VOL 407.
- Jakkula, M., T. D. Le Cras, S. Gebb, K. P. Hirth, R. M. Tuder, N. F. Voelkel, and S. H. Abman, (2000), Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung: Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v. 279, p. L600-7.
- Jimenez, B. E., and J. W. Murphy, (1984). In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: Infect Immun, v. 46, p. 552-8.
- Kamei, K., Coccidioidomycosis and paracoccidioidomycosis: Nihon Rinsho, v. 68 Suppl 6, p. 267-70.
- Kasahara, Y., R. M. Tuder, L. Taraseviciene-Stewart, T. D. Le Cras, S. Abman, P. K. Hirth, J. Waltenberger, and N. F. Voelkel, (2000), Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema: J Clin Invest, v. 106, p. 1311-9.
- Klein, B. S., and B. Tebbets, (2007), Dimorphism and virulence in fungi: Curr Opin Microbiol, v. 10, p. 314-9.

- Korpanty, G., E. Smyth, L. A. Sullivan, R. A. Brekken, and D. N. Carney, (2010), Antiangiogenic therapy in lung cancer: focus on vascular endothelial growth factor pathway: *Exp Biol Med* (Maywood), v. 235, p. 3-9.
- Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, (2011), Pathogen Recognition by the Innate Immune System *International Reviews of Immunology*.
- Kurokawa, C. S., J. P. Araujo, Jr., A. M. Soares, M. F. Sugizaki, and M. T. Peracoli, (2007), Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*: *Microbiol Immunol*, v. 51, p. 421-8.
- Lacaz, C. d. S., (2002), tratado de micologia médica: São Paulo, Sarvier
- Laemmli, U. K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. : *Nature*.
- Lindblad, E. B., (2004), Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol*
- Livonesi, M., M. Rossi, J. de Souto, A. Campanelli, R. de Sousa, C. Maffei, B. Ferreira, R. Martinez, and J. da Silva, (2009), Inducible nitric oxide synthase-deficient mice show exacerbated inflammatory process and high production of both Th1 and Th2 cytokines during paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*.
- Loth EA, d. C. S., da Silva JR, Gandra RF., (2011), Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Paraná: *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v. vol.44.
- Loures, F. V., A. Pina, M. Felonato, E. F. Araujo, K. R. Leite, and V. L. Calich, (2010), Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells: *Infect Immun*, v. 78, p. 1078-88.

- Loures, F. V., A. Pina, M. Felonato, and V. L. G. Calich, (2009). TLR2 Is a Negative Regulator of Th17 Cells and Tissue Pathology in a Pulmonary Model of Fungal Infection¹. *The Journal of Immunology*.
- Loures, F. V., A. Pina, M. Felonato, C. Feriotti, E. F. de Araujo, and V. L. Calich, (2011), MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* infection: *Infect Immun*, v. 79, p. 2470-80.
- Lukacs, N. W., C. Hogaboam, Stephen W. Chensue, K. Blease, and Steven L. Kunkel, (2001). Type 1/Type 2 Cytokine Paradigm and the Progression of Pulmonary Fibrosis. *CHEST*.
- Lyon, A. C., M. M. Teixeira, S. A. Araujo, M. C. Pereira, E. R. Pedroso, and A. L. Teixeira, 2009, Serum levels of sTNF-R1, sTNF-R2 and CXCL9 correlate with disease activity in adult type paracoccidioidomycosis: *Acta Trop*, v. 109, p. 213-8.
- Magalhães, A., K. S. Ferreira, S. R. Almeida, J. D. Nosanchuk, L. R. Travassos, and C. P. Taborda, (2012). Prophylactic and Therapeutic Vaccination Using Dendritic Cells Primed with Peptide¹⁰ Derived from the 43-Kilodalton Glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*: *Clin. Vaccine Immunol*.
- Marques, S. A., (2003), *Paracoccidioidomycosis: Epidemiological, Clinical and Treatment up-date: An bras Dermatol: Rio de Janeiro*.
- Marques, A. F., da Silva, M.B., Juliano, M.A., Travassos, L.R. e Taborda, C.P. , 2006, Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. : *Antimicrob Agents Chemother* .
- Marti, H. H. (2000). Vascular Endothelial Growth Factor *in* Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Landes Bioscience; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6149>.

- Martinez, R., (2010). Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.
- Martins, E. M. d. N., B. S. Reis, M. A. de Resende, A. S. de Andrade, and A. M. Goes, (2009). Mice immunization with radioattenuated yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*: influence of the number of immunizations: *Mycopathologia*, v. 168, p. 51-8.
- Marwick, J. A., I. Edirisinghe, G. Arunachalam, C. S. Stevenson, W. Macnee, P. A. Kirkham, and I. Rahman, (2010). Cigarette smoke regulates VEGFR2-mediated survival signaling in rat lungs: *J Inflamm (Lond)*, v. 7, p. 11.
- Marwick, J. A., C. S. Stevenson, J. Giddings, W. MacNee, K. Butler, I. Rahman, and P. A. Kirkham, (2006), Cigarette smoke disrupts VEGF165-VEGFR-2 receptor signaling complex in rat lungs and patients with COPD: morphological impact of VEGFR-2 inhibition: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 290, p. L897-908.
- McEwen, J., Ortiz BL, A. García, A. Florez, S. Botero, and A. Restrepo, (1996), Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*.: *Fungal Genet Biol*.
- Monteiro da Silva, J. L., P. F. Andreotti, and M. J. S. Mendes-Giannini, (2005), Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células endoteliais. *Rev. Ciênc. Farm. Básica* v. v. 26, n.2, p. 149-156.
- Moreira, A. P., K. A. Cavassani, F. S. Massafra Tristao, A. P. Campanelli, R. Martinez, M. A. Rossi, and J. S. Silva, (2008), CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression: *J Immunol*, v. 180, p. 3049-56.
- Moreira, A. P. V., (2008), BEPA-Boletim Epidemiológico Paulista, in S. d. I. Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Serviço de Microbiologia e Imunologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz (IAL),

Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP), .

Moura, A. C. L. d., (2008), Estudo Clínico E Imunológico De Controle De Cura De Paracoccidiodomicose Crônica, Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte.

Muniz, M. A. S., E. Marchiori, M. Magnago, L. Beatriz, M. Moreira, and J. G. d. A. Junior, (2002), Paracoccidiodomicose pulmonar – aspectos na tomografia computadorizada de alta resolução: Rio de Janeiro, Radiol Bras

Nabavi, N., and J. W. Murphy, (1986). Antibody-dependent natural killer cell-mediated growth inhibition of *Cryptococcus neoformans*. 51:556–562.: Infect. Immun.

Nakagawa Itano E, Uno J, Sano A, Yarita K, Kamei K, Miyaji M, Nishimura K, and M. Y., (2002), Detection of the gp43 gene and (1-3)-beta-D-glucan of *Paracoccidoides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice: Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.

Nakaira-Takahagi, E., M. A. Golim, C. F. Bannwart, R. Puccia, and M. T. Peracoli, Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidoides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes: Med Mycol, v. 49, p. 694-703.

Nascimento, F. R. F., V. L. G. Calich, D. Rodríguez, and M. Russo, (2002). Dual Role for Nitric Oxide in Paracoccidiodomycosis: Essential for Resistance, but Overproduction Associated with Susceptibility J Immunol.

Negro, G. M. B. D., C. N. Pereira, H. F. Andrade, S. A. Palacios, M. M. S. Vidal, C. E. Charbel, And G. Benard, (2000). Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidiodomycosis J. Med. Microbiol.

- Nishikaku, A. S., and E. Burger, (2003), Immunohistochemical demonstration of TGF- β and decorin in paracoccidioidal granulomas: *Brazilian Journal of medical and Biological*.
- Nishikaku, A. S., R. F. Molina, L. C. Ribeiro, R. Scavone, B. P. Albe, C. S. Cunha, and E. Burger, (2009), Nitric oxide participation in granulomatous response induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: *Med Microbiol Immunol*, v. 198, p. 123-35.
- Oliveira, J. C. d., (2012), *Tópicos em Micologia Médica: Rio de Janeiro/Brasil*, Controllab, 225 p.
- Oliveira, K. B. d., T. C. Fujita, J. M. M. Oda, and M. N. Aori, (2007), Involvement of chemokines and its receptors in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases.: *BIOSAÚDE*, v. 9.
- Oliveira, S. J., R. L. Mamoni, C. C. Musatti, P. M. O. Papaiordanou, and M. H. S. L. Blotta, (2002), Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes and Infection*.
- Ortiz, B. L., S. Diez, M. E. Uran, J. M. Rivas, M. Romero, V. Caicedo, A. Restrepo, and J. G. McEwen, 1998, Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis: *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 5, p. 826-30.
- Palmeiro, M., K. Cherubini, and L. S. Yurgel, (2005). *Paracoccidioidomycosis – Literature Review*, v. 15: Porto Alegre *Scientia Medica*.
- Panunto-Castelo, A., G. Freitas-da-Silva, I. C. Bragheto, R. Martinez, and M. C. Roque-Barreira, (2003), *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis: *Microbes Infect*, v. 5, p. 1205-11.
- Parise-Fortes, M., M. SA, S. AM, K. CS, M. ME, and P. MT.,(2006). Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous

lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. *Br J Dermatol*.

Parolin, M. B., and I. J. M. Reason, (2001), Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares: *Arq Gastroenterol* v. V. 38.

Paule, B., L. Bastien, E. Deslandes, O. Cussenot, M. P. Podgorniak, Y. Allory, B. Naimi, R. Porcher, A. de La Taille, S. Menashi, F. Calvo, and S. Mourah, (2010), Soluble isoforms of vascular endothelial growth factor are predictors of response to sunitinib in metastatic renal cell carcinomas: *PLoS One*, v. 5, p. e10715.

Perl, M., C.-S. Chung, and A. Ayala, (2005), Apoptosis. *Crit Care Med*, v. 33.

Pierce, E.M, Carpenter K, Jakubzick C, Kunkel S.L, Evanoff H, Flaherty K.R, Martinez F.J, Toews G.B, Hogaboam C.M, (2007), Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts migrate and proliferate to CC chemokine ligand 21.: *Eur Respir J*.

Pina, A., P. H. Saldiva, L. E. Restrepo, and V. L. Calich, (2006), Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts: *J Leukoc Biol*, v. 79, p. 1202-13.

Pinto, J. G., L. A. Martins, J. S. Cavalheiro, M. J. Acorsi, S. C. Pedrini, A. M. Soares, and S. L. Oliveira, (2006), Cytokine production in lungs and adrenal glands of high and low antibody producing mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*: *Med Mycol*, v. 44, p. 505-14.

Pinzan, C. F., L. P. Ruas, A. S. Casabona-Fortunato, F. C. Carvalho, and M. C. Roque-Barreira, (2010). Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection: *PLoS One*, v. 5, p. e10757.

Pop, C., and G. S. Salvesen,(2009). Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation: *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* v. VOL. 284.

- Prophet, E. B., B. Mills, J. B. Arrington, and L. H. Sobin,(1992). Laboratory methods in histotechnology. : Armed Forces Institute of Pathology.
- Pujol-Rique, M., S. Ruiz, C. Alonso-Tarres, and C. Canete, Pulmonary mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis*: dangerous confusion with sarcoidosis: Radiologia, v. 53, p. 560-563.
- Ramos, E. S. M., and E. Saraiva Ldo, (2008). Paracoccidioidomycosis: Dermatol Clin, v. 26, p. 257-69, vii.
- Reis, B. S., A. Bozzi, F. L. Prado, M. C. Pereira, F. E. Ferreira, P. Godoy, L. Moro, E. P. Pedroso, M. F. Leite, and A. M. Goes, (2005), Membrane and extracellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* (Mexo): identification of a 28-kDa protein suitable for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis: J Immunol Methods, v. 307, p. 118-26.
- Reis, B. S., V. C. Fernandes, E. M. Martins, R. Serakides, and A. M. Goes, (2008). Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*: Vaccine, v. 26, p. 5461-9.
- Restrepo, A., G. Benard, C. C. de Castro, C. A. Agudelo, and A. M. Tobon, (2008). Pulmonary paracoccidioidomycosis: Semin Respir Crit Care Med, v. 29, p. 182-97.
- Restrepo, A., L. E. Cano, and A. M. Tabares, (1983) A comparison of mycelial filtrate - and yeast lysate-paracoccidioidin in patients with paracoccidioidomycosis: Mycopathologia.
- Richard, A., Lockshin, And Z. Zakeri, (2001). Programmed Cell Death And Apoptosis: Origins Of The Theory. Nature Reviews | Molecular Cell Biology V. 2.
- Rodrigues, D. R., L. A. Dias-Melicio, S. A. Calvi, M. T. Peracoli, and A. M. Soares, (2007). *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites: Med Mycol, v. 45, p. 27-33.

- Romano, C. C., M. J. Mendes-Giannini, A. J. Duarte, and G. Benard, (2002). IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients: *Cytokine*, v. 18, p. 149-57.
- San-Blas, G., and G. Nino-Vega, (2008), *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy: *Mycopathologia*, v. 165, p. 183-95.
- Sánchez-Sánchez, N., L. Riol-Blanco, and J. L. Rodríguez-Fernández, (2006). The Multiple Personalities of the Chemokine receptor CCR7 in Dendritic Cells: *Journal Immunol.*
- Santos, L. d. S., V. C. Fernandes, S. G. Cruz, W. C. Siqueira, A. M. Goes, and E. R. Pedroso, (2012). Profile of total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 levels in sera of patients with paracoccidioidomycosis: treatment follow-up using Mexo and rPb27 as antigens in an ELISA: *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 1-10.
- Santos, S. S. d., K. S. Ferreira, and S. R. Almeida, (2011). *Paracoccidioides brasiliensis*-induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes: *PLoS One*, v. 6, p. e19690.
- Santos, S. d., F. K. S., and A. S. R., (2011), *Paracoccidioides brasiliensis*-induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes: *PLoS One*, v. 6, p. e19690.
- Sato, P. K., (2010). Estudo de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose: expressão de moléculas de superfície e secreção de citocinas, USP, São Paulo/Brasil.
- Shikanai-Yasuda, M. A., Q. Telles Filho Fde, R. P. Mendes, A. L. Colombo, and M. L. Moretti, (2006). Guidelines in paracoccidioidomycosis: *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 39, p. 297-310.
- Shinoda H, T. S., Fujishima S, Yamasawa W, Miyamoto, and N. Y. K, Kamata H, Hasegawa N, and Ishizaka A, (2009). Elevated CC chemokine level in

bronchoalveolar lavage fluid is predictive of a poor outcome of idiopathic pulmonary fibrosis: *Respiration*.

Silva, C., M. Silva, L. Faccioli, R. Pietro, S. Cortez, and N. Foss, 1995, Differential correlation between interleukin patterns in disseminated and chronic human paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol*.

SILVA, C. L., Silva MF, Faccioli LH, Pietro RC, Cortez AS, Foss N.T.(1985), Granulomatous reaction induced by lipids isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trans. roy. Soc. trop. Med.*

Silva, F. C. D., T. I. E. Svidzinski, E. V. Patussi, C. P. Cardoso, M. M. D. O. Dalalio, and L. Hernandez, (2009). Morphologic Organization of Pulmonary Granulomas in Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*: *Am. J. Trop. Med.* .

Silva, S. H. M. d., A. L. Colombo, M. H. S. L. Blotta, F. Queiroz-Telles, A. B. Balthazar, J. D. Lopes, and a. Z. P. d. Camargo,(2006), Diagnosis of Paracoccidioidomycosis by Detection of Antigen and Antibody in Bronchoalveolar Lavage Fluids: *American Society for Microbiology*.

Siqueira, K. Z., (2009), Efeito da Interleucina-6 sobre a atividade fungicida e produção de citocinas por monócitos humanos, infectados in vitro com cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis*.: *Med Mycol*.

Siqueira, K. Z., A. M. Campos Soares, L. A. Dias-Melicio, S. A. Calvi, and M. T. Peracoli, (2009), Interleukin-6 treatment enhances human monocyte permissiveness for *Paracoccidioides brasiliensis* growth by modulating cytokine production: *Med Mycol*, v. 47, p. 259-67.

Slee, E. A., C. Adrain, and S. J. Martin, (2001). Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis: *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, v. 276.

Soong, L., Duboise, S.M., Kima, P. e McMahon-Pratt, D.(1995). *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis: *Infect Immun*

- Souto, J. T., J. C. Aliberti, A. P. Campanelli, M. C. Livonesi, C. M. Maffei, B. R. Ferreira, L. R. Travassos, R. Martinez, M. A. Rossi, and J. S. Silva, (2003), Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma: Am J Pathol, v. 163, p. 583-90.
- Suzuki, E., M. S. Toledo, H. K. Takahashi, and A. H. Straus. (1997). A monoclonal antibody directed to terminal residue of B-galactofuranose of a glycolipid antigen isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*: cross-reactivity with *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi*.: Glycobiology.
- Takeuchi, O., and S. Akira, (2010), Pattern Recognition receptors and Inflammation: CELL, v. 140, p. 805-820.
- Tavares, A. H., L. S. Derengowski, K. S. Ferreira, S. S. Silva, C. Macedo, A. I. L. Bocca, G. A. Passos, S. R. Almeida, and I. Silva-Pereira, (2012), Murine Dendritic Cells Transcriptional Modulation upon *Paracoccidioides brasiliensis* Infection: Plos one, v. 6.
- Tercarioli, G. R., E. Bagagli, G. M. Reis, R. C. Theodoro, M. Bosco Sde, S. A. Macoris, and V. B. Richini-Pereira, (2007), Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection: BMC Microbiol, v. 7, p. 92.
- Trujillo, G., A. Hartigan, and C. Hogaboam, (2010). T regulatory cells and attenuated bleomycin-induced fibrosis in lungs of CCR7^{-/-} mice Fibrogenesis Tissue Repair.
- Unterkircher, C. S., M. V. P. Leão, M. H. S. L. Blotta, and Z. P. d. Camargo, (2004), Natural Antibodies In Paracoccidioidomycosis: Brazilian Journal of Microbiology.
- Urakami, T., A. R. Cardones, And S. T. Hwang, (2004), Chemokine receptors and melanoma metastasis.: J Dermatol Sci.

Valério, M. J. A., and Â. M. V. d. C. S. A. D. Melicio, (2009). Papel Dos Receptores Toll-Like na atividade dos neutrófilos humanos desafiados com a cepa de alta virulência do *Paracoccidioides brasiliensis*, Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista, Brasil.

Verícimo, M. A., K. M. França, A. C. V. Arnholdt, and T. L. Kipnis, (2006), Increased apoptosis during the early phase of experimental paracoccidioidomycosis as a phenotypic marker of resistance: *Microbes and Infection*.

Visbal, G., G. San-Blas, J. Murgich, and H. Franco, (2005), *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics: *Curr Drug Targets Infect Disord*, v. 5, p. 211-26.

Voelkel, N. F., C. Cool, L. Taraceviene-Stewart, M. W. Geraci, M. Yeager, T. Bull, M. Kasper, and R. M. Tuder, (2002), Janus face of vascular endothelial growth factor: the obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension: *Crit Care Med*, v. 30, p. S251-6.

Voelkel, N. F., R. W. Vandivier, and R. M. Tuder, (2006). Vascular endothelial growth factor in the lung: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 290, p. L209-21.

Wanke, B., and M. A. Aide, (2009). Chapter 6--paracoccidioidomycosis: *J Bras Pneumol*, v. 35, p. 1245-9.

Wilson, M., and T. Wynn, 2008, Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation: *Mucosal Immunol*.

Xander, P., Vigna, A.F., Feitosa Ldos, S., Pugliese, L., Bailao, A.M., Soares,C.M., Mortara, R.A., Mariano, M. e Lopes, J.D. , (2007), A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. : *Microbes Infect*.

Yoshida, T., A. Ohnuma, H. Horiuchi, and T. Harada, (2011). Pulmonary Fibrosis in Response to Environmental Cues and Molecular Targets Involved in Its Pathogenesis: J Toxicol Pathol

Zaas, A. K., and D. A. Schwartz, (2005), Innate immunity and the lung: defense at the interface between host and environment: Trends Cardiovasc Med, v. 15, p. 195-202.

Zago, T. M., Inflamação medUnicamp XLVI.

Zaia, D. A. M., C. T. B. V. Zaia, and J. Lichtig, (1998), Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods.: Qu m. Nova, v. 21.