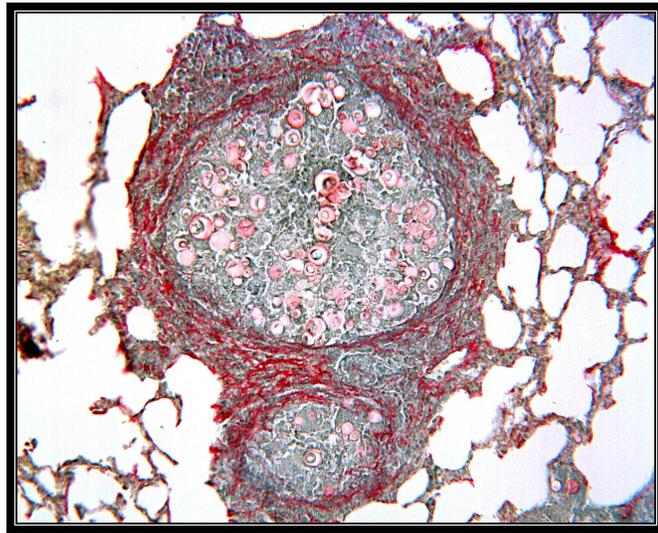


**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**PROTEÍNAS LIGANTES DE FETUÍNA:
CARACTERIZAÇÃO E PAPEL BIOLÓGICO
NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL.**



LEANDRO LICURSI DE OLIVEIRA

**RIBEIRÃO PRETO
--2007--**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

PROTEÍNAS LIGANTES DE FETUÍNA:
CARACTERIZAÇÃO E PAPEL BIOLÓGICO
NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL.

LEANDRO LICURSI DE OLIVEIRA

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências, área de concentração
Imunologia Básica e Aplicada

RIBEIRÃO PRETO
--2007--

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

PROTEÍNAS LIGANTES DE FETUÍNA:
CARACTERIZAÇÃO E PAPEL BIOLÓGICO
NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL.

LEANDRO LICURSI DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: ADEMILSON PANUNTO CASTELO

RIBEIRÃO PRETO
--2007--

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| INTRODUÇÃO | 4 |
| 1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 4 |
| 1.1. Aspectos gerais..... | 4 |
| 1.2. Defesa imunitária..... | 5 |
| 1.3. Antígenos de <i>P. brasiliensis</i> | 10 |
| OBJETIVO | 15 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 1. Animais | 16 |
| 2. Cultivo de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 16 |
| 3. Antígeno total de <i>P. brasiliensis</i> (PbAg) | 16 |
| 4. Cromatografia de afinidade | 17 |
| 5. Análise de eletroforética e transferência de proteínas | 17 |
| 6. Preparação do extrato de pulmão biotilado | 18 |
| 7. Caracterização da interação FBP com matriz extracelular de pulmão..... | 18 |
| 8. Seqüenciamento protéico | 19 |
| 8.1. Degradação de Edman | 19 |
| 8.2. Espectometria de massa | 19 |
| 9. Determinação de viabilidade dos fungos | 20 |
| 10. Infecção dos camundongos com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> | 21 |
| 11. Protocolo de tratamento da PCM experimental..... | 21 |
| 12. Soro de animais infectados..... | 22 |
| 13. Processamento dos órgãos..... | 22 |
| 14. Análise histopatológica | 23 |
| 15. Análise morfométrica dos granulomas..... | 23 |
| 16. ELISA..... | 24 |
| 16.1. Dosagem de citocinas..... | 24 |
| 16.2. Dosagem de anticorpos séricos..... | 24 |
| 16.3. Determinação de antígenos de <i>P. brasiliensis</i> circulantes | 25 |

| | |
|--|----|
| 17. Obtenção de células esplênicas e estimulação <i>in vitro</i> | 26 |
| 18. Ensaio de proliferação celular com CFSE..... | 26 |
| 19. Citometria de fluxo | 27 |
| 20. Análise estatística..... | 28 |
| RESULTADOS | 29 |
| 1. Purificação e caracterização das proteínas ligantes de fetuína (FBP)..... | 29 |
| 2. FBP induz supressão de resposta imunitária na PCM experimental | 37 |
| 2.1. Análise do pulmão dos animais infectados por <i>P. brasiliensis</i> | 38 |
| 2.2. Análise do fígado dos animais infectados por <i>P. brasiliensis</i> | 45 |
| 2.3. Análise do baço dos animais infectados por <i>P. brasiliensis</i> | 48 |
| 2.4. Sorologia dos animais infectados por <i>P. brasiliensis</i> | 51 |
| 3. FBP induz padrão de resposta Th2 <i>in vitro</i> | 54 |
| 4. Determinação dos fatores que induzem imunossupressão por FBP <i>in vivo</i> | 58 |
| DISCUSSÃO | 65 |
| CONCLUSÕES | 71 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 72 |

RESUMO

No presente trabalho descrevemos o isolamento de proteínas do antígeno total de *Paracoccidioides brasiliensis*, através de cromatografia de afinidade em coluna de fetuína-agarose. O material adsorvido à resina e eluído com NaCl, foi chamado de FBP (do inglês Fetuin Binding Proteins), e não apresentava atividade enzimática nem lectínica, tendo sua associação a fetuína dependente de cátions divalentes. A análise eletroforética da preparação FBP revelou uma proteína proeminente de 60kDa e quatro minoritárias de 50, 35, 24 e 14kDa. A proteína de 60kDa de FBP foi capaz de se ligar à matriz extracelular de pulmão de camundongo, sugerindo que poderia ser importante no processo infeccioso, tornando-se um alvo para intervenção terapêutica. Quando tratamos camundongos infectados com *P. brasiliensis* por 21 dias com FBP ou salina emulsificada com adjuvante completo de Freund (do inglês CFA – Complete Freund's Adjuvant), um forte indutor de resposta protetora Th1 na paracoccidioidomicose (PCM), observamos que os animais tratados com CFA foram protegidos, enquanto os animais tratados com FBP + CFA tinham reversão dessa proteção. Estes animais apresentaram grande número de unidades formadoras de colônias (do inglês CFU – Colony-forming unit), revelando na análise histopatológica granulomas bem formados repletos de fungos viáveis, porém sem grande comprometimento pulmonar, quando comparado aos animais infectados não tratados, que apresentavam uma inflamação crônica que atingia grande extensão do parênquima pulmonar. Além disso, homogenatos dos pulmões dos camundongos tratados com FBP apresentaram maiores níveis de IL-2, IL-4 e IL-10, características de um padrão Th2, além de TGF- β . Quando analisamos as células do baço desses animais, observamos uma diminuição de células T CD8⁺ em relação ao grupo tratado com CFA. Células CD8⁺ dos animais tratados com FBP apresentaram o marcador de uma população de células T reguladoras (T CD8⁺reg), o Foxp3. Tendo como base esses resultados,

avencamos a hipótese de que esses linfócitos T CD8⁺reg seriam responsáveis pela supressão da resposta imunitária protetora disparada pelo CFA, o que permitiria a persistência de fungos viáveis no interior dos granulomas. Além disso, animais tratados com FBP apresentam níveis aumentados de TGF- β no epitélio pulmonar, o que aumentaria a supressão no órgão. O conjunto de resultados apresentados sugere que FBP desempenha papel importante na imunossupressão característica da PCM, abrindo perspectivas de que uma intervenção nesse processo supressivo possa levar a um efeito benéfico na gravidade da PCM.

ABSTRACT

In the present study we described the isolation in the NaCl 1M-eluted fraction (FBP) fraction upon affinity chromatography on immobilized fetuin of the soluble antigen fraction from *P. brasiliensis*. Although these fetuin-binding proteins were divalent cation-dependent, they did not present either enzymatic or lectin activity. Electrophoresis analysis of FBP revealed a major protein of 60 kDa and four minor proteins of 50, 35, 24 e 14kDa. In a blotting assay, we showed that 60 kDa protein was bound by pulmonary extracellular matrix from mouse, suggesting that FBP can play important role in the paracoccidioidomycosis (PCM) and, consequently, be a therapy target. When mice were treated 21 days postinfection with FBP or saline emulsified in complete Freund adjuvant (CFA), a strong adjuvant to protective Th1 immune response against PCM, we observed that CFA-treated mice were protected, whereas FBP + CFA-treated mice reversed the protection. Although lungs from FBP + CFA-treated mice presented organized granulomas with few compromised tissue, there was a large number of viable fungi inside the granuloma. Consequently, the CFU number in the organs of these mice was higher than that from CFA-treated mice. In addition, lung homogenates from FBP mice had high levels of TGF- β and IL-2, besides Th2 pattern cytokines IL-4 and IL-10. When spleen cells from FBP mice were analyzed, we observed a decreasing of CD8⁺ T cells in relation to CFA group, and presence of regulator T cell the marker Foxp3. (CD8⁺ Treg). On the basis of these results, we hypothesized that CD8⁺ Treg suppressed the protector immune response triggered by CFA, leading to persistent viable fungi infection inside the granulomas. Moreover, high levels of TGF- β , a known immunosuppressor cytokine, were observed in the pulmonary epithelium from FBP + CFA-treated mice. Altogether, these results indicate that FBP plays an important role in the immunosuppression produced on course of *P. brasiliensis* infection, and open perspectives of intervention in this suppressive process, leading to a beneficial effect on the infection severity.

INTRODUÇÃO

1. *Paracoccidioides brasiliensis*

1.1. Aspectos gerais

Paracoccidioides brasiliensis é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma doença sistêmica de natureza granulomatosa. A infecção é autóctone e endêmica em países da América Latina, sendo Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela os países com maiores incidências (BLOTTA *et al.*, 1999). O Brasil corresponde ao país com maior número de áreas endêmicas, abrigando 85% de todos os casos relatados de PCM, com maior prevalência nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (RESTREPO, 1985; VERLI *et al.*, 2005).

O primeiro relato da doença humana foi feito por Lutz (1908 apud NEGRONI, 1993), que detectou o fungo em lesões da mucosa oral de dois pacientes. *P. brasiliensis* é conhecido apenas em sua forma assexuada e apresenta dimorfismo termodependente, crescendo na forma filamentosa a 25°C e de levedura a 37°C, provavelmente existindo na natureza em determinados nichos ecológicos, a partir dos quais o homem inala os fragmentos micelianos ou conídios (SEVERO *et al.*, 1979; KUROKAWA *et al.*, 1998). Assim, o estabelecimento da doença, com lesões primárias freqüentes nos pulmões, marca a transformação do fungo da forma miceliana (infectante) para a forma de levedura (patogênica) (MCEWEN *et al.*, 1987a)

Inicialmente, a doença envolve os pulmões, onde são formados os granulomas responsáveis pelo controle da disseminação do fungo para outros órgãos (DE BRITO e FRANCO, 1994). As manifestações estão associadas a fatores relacionados com o fungo, como a virulência e a patogenicidade (SAN-BLAS e SAN-BLAS, 1977), e com o hospedeiro, como a suscetibilidade (maior incidência entre o sexo masculino em relação ao feminino) e o estado imunitário (ROBLEDO *et al.*, 1982; COUTINHO *et al.*, 2002). Na dependência desses fatores, a infecção pode regredir com a destruição ou persistência de fungos viáveis em focos

quiescentes ou ainda progredir com o desenvolvimento de lesões ativas, proliferação e disseminação do fungo (FRANCO *et al.*, 1987; MONTENEGRO e FRANCO, 1994).

Um largo espectro de manifestações clínicas, patológicas e imunológicas pode ser observado nos pacientes infectados, variando de infecção pulmonar assintomática, que compreendem o maior número de indivíduos, à doença grave disseminada. Mais de 90% dos pacientes com manifestações clínicas apresentam a forma crônica da doença (FC), com alta frequência de envolvimento pulmonar, muco-cutâneo, e das adrenais. Já a forma aguda da doença (FA) acomete indivíduos jovens, com envolvimento de linfonodos, fígado, baço, ossos, glândulas supra-renais e medula óssea (FRANCO *et al.*, 1987; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

1.2. Defesa imunitária

Historicamente, imunidade estava ligada à idéia de proteção de doenças infecciosas. A imunidade é dependente de células e moléculas que agem coordenadas e coletivamente, e que constituem o sistema imunitário. Sabe-se hoje que esse sistema cumpre funções de (a) manutenção de homeostase por ser capaz de distinguir o que é próprio do organismo daquilo que é estranho, (b) apresentar mecanismos para eliminação das estruturas estranhas (antígenos) e (c) promover a auto-regulação (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

A imunidade pode ser dividida em dois tipos, inata e adquirida. A imunidade inata, feita pelas barreiras físicas (pele, acidez estomacal, etc.), células fagocíticas e eosinófilos, células naturalmente citotóxicas (NK) e proteínas do sistema complemento. No caso da infecção por *P. brasiliensis*, destaque tem sido dado às células fagocíticas. O contato inicial desse fungo com o sistema imunitário do hospedeiro faz-se através das células fagocíticas, uma vez que nos locais onde se encontram as células fúngicas há grande acúmulo de neutrófilos (MCEWEN *et al.*, 1987b). Neutrófilos humanos exercem importante efeito

fungistático, que é potenciado por interferon (IFN)- γ e pode desempenhar papel na resistência do hospedeiro na fase inicial da infecção por *P. brasiliensis* (KURITA *et al.*, 1999; KURITA *et al.*, 2000). Embora *P. brasiliensis* induza a ativação do sistema complemento através da via alternativa, o que propicia sua opsonização e conseqüente captura por fagócitos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1997), componentes do próprio fungo parecem também cumprir essa função, como descrito para a glicoproteína de 43kDa (gp43) (ALMEIDA *et al.*, 1998).

Os macrófagos, além dos neutrófilos, podem ser decisivos na resultante da infecção por *P. brasiliensis*, uma vez que os macrófagos murinos residentes são permissivos à multiplicação de leveduras fagocitadas, enquanto macrófagos ativados restringem a multiplicação fúngica intracelular (BRUMMER *et al.*, 1989). Macrófagos ativados exercem atividade fungicida *in vitro* e *in vivo* (BRUMMER *et al.*, 1988; MOSCARDI-BACCHI *et al.*, 1994), limitam a disseminação de *P. brasiliensis* durante os estágios iniciais da infecção, o que está correlacionado à produção de altos níveis de TNF- α (PARISE-FORTES *et al.*, 2000).

Quando os mecanismos de imunidade inata não conseguem bloquear e eliminar um determinado antígeno, inicia-se então a fase cognitiva da resposta. Nessa fase, o antígeno é capturado por células apresentadoras de antígenos profissionais (APC), como células dendríticas e macrófagos, é processado, ocorrendo clivagem em pequenos fragmentos ou peptídeos que se complexam a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC); esses complexos são transportados e expostos na superfície da APC. Assim, os antígenos são apresentados para linfócitos T CD4⁺ (células T *helper* – Th) específicos, que sob determinadas condições de estimulação se diferenciarão em células Th1 e Th2. O desenvolvimento diferencial dos linfócitos Th1 e Th2 parece ser o determinante fisiológico, e mesmo patológico, das respostas imunitárias, incluindo doenças auto-imunes, alergias e infecções. As respostas de células Th1, mediadas principalmente pela secreção de IFN- γ e TNF- α , são responsáveis por proteção contra parasitas intracelulares, doenças auto-imunes

órgão específicas, rejeição de enxerto e alguns tipos de abortos recorrentes. Já as respostas de células Th2, que produzem interleucina (IL)-4, IL-5, IL-10 e IL-13, estão envolvidas em proteção contra parasitas metazoários, atopia, gravidez normal, algumas síndromes hipereosinofílicas idiopáticas, esclerose sistêmica e progressão da AIDS na infecção por HIV.

Embora os macrófagos e, principalmente, as células dendríticas (DCs) sejam importantes para fazer essa transição entre a imunidade inata e adaptativa através da ativação de linfócitos T, na PCM, esses dois tipos celulares são pouco eficientes na estimulação de células Th1 (ALMEIDA e LOPES, 2001). A infecção por *P. brasiliensis*, ou mesmo seus antígenos purificados, tal como a gp43, diminuem a expressão de moléculas do MHC de classe II e as propriedades adesivas de DCs imaturas, além de exercer efeito inibitório sobre a produção de IL-12 e TNF- α , inviabilizando o estabelecimento de resposta dos linfócitos Th1, importantes para eliminação de patógenos intracelulares (FERREIRA *et al.*, 2004).

A depressão da resposta mediada por células T durante a infecção por *P. brasiliensis* tem sido atribuída a fatores séricos produzidos pelo hospedeiro (DA COSTA *et al.*, 1983), anticorpos específicos (CASTANEDA *et al.*, 1985), imunocomplexos e populações de células supressoras (SUGIZAKI *et al.*, 1999). O mecanismo que leva à ausência de resposta das células T aos antígenos de *P. brasiliensis* é controverso. Há evidências de que a produção de altos níveis de óxido nítrico (NO), que seria indicativa de destruição e controle do fungo, seja associada à imunossupressão (BOCCA *et al.*, 1998; SOUTO *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2002). Por outro lado, células de pacientes infectados expressam altos níveis de CTLA-4, anexina V e FasL. Tais observações originaram a hipótese de que a apoptose mediada por Fas-FasL e CTLA-4 esteja envolvida na modulação da resposta imune em pacientes infectados com *P. brasiliensis* (CACERE *et al.*, 2002; CAMPANELLI *et al.*, 2003).

Embora haja no hospedeiro humano uma complexidade de mecanismos moduladores e de fatores externos que interferem com o estabelecimento e desenvolvimento da PCM,

estudos bem definidos em modelos experimentais têm mostrado uma correlação entre o padrão de resposta imunitária celular Th1 e menor gravidade da doença (ROBLEDO *et al.*, 1982; CANO *et al.*, 1998; KASHINO *et al.*, 2000; PINA *et al.*, 2004). Respostas de tipo Th2, associadas às formas disseminadas de PCM, ou Th1, associadas às formas mais localizadas (focais) da doença, dependem fundamentalmente do padrão de citocinas secretadas pelas células do sistema imunológico (revisto por CALICH e KASHINO, 1998; KASHINO *et al.*, 2000).

Modelo experimental de infecção por *P. brasiliensis* em camundongos susceptíveis (B10/A) e resistentes (A/Sn) demonstrou que macrófagos de animais susceptíveis secretam altos níveis de TGF- β e baixos níveis de TNF- α , verificando-se ainda, produções baixas de IFN- γ e altas de IL-5 e IL-10. Já nos camundongos resistentes, constatou-se perfil oposto de secreção de citocinas acompanhado das produções precoce de IFN- γ e IL-2, e tardia de IL-4 e IL-5. Assim, reforça-se a idéia de que a resistência à infecção por *P. brasiliensis* esteja associada à secreção de altos níveis de TNF- α e IFN- γ , seguida de produção contínua de IL-2 e IFN- γ . Por outro lado, a liberação pequena e efêmera de TNF- α e IFN- γ , associada à produção de IL-5, IL-10 e TGF- β , ocorre na forma aguda e subaguda da PCM, como a que acomete os animais susceptíveis (revisto por CALICH e KASHINO, 1998; KASHINO *et al.*, 2000). De fato, vários estudos têm demonstrado claramente a participação de TNF- α e IFN- γ no desenvolvimento de uma resposta imunitária protetora à infecção experimental por *P. brasiliensis* (CANO *et al.*, 1998; SOUTO *et al.*, 2000; CALVI *et al.*, 2003b).

Assim como ocorre em modelos experimentais, pacientes com uma forma disseminada de PCM apresentam altos níveis de IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β , e baixos níveis de IFN- γ , quando comparados aos pacientes com uma forma crônica da doença (BAIDA *et al.*, 1999; BENARD *et al.*, 2001; MAMONI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002; MAMONI e BLOTTA, 2005).

Outras células que atuam como efetores da imunidade adaptativa, como os linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B, podem ter importante papel na patogênese da PCM. Os linfócitos T CD8⁺ são encontrados no lavado broncoalveolar (do inglês BAL – bronchoalveolar lavage) de pacientes com PCM, possivelmente atraídos ao sítio da infecção pela quimiocina MIP-1 α (FORNAZIM *et al.*, 2003). Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-1, MIP-2, podem ser responsáveis pelo recrutamento de leucócitos para o pulmão nos estágios iniciais da infecção (GONZALEZ *et al.*, 2003). A alta expressão de citocinas antiinflamatórias na lesão de pacientes com a forma aguda de PCM pode contribuir para o escape do fungo dos mecanismos de defesa do hospedeiro (NEWORAL *et al.*, 2003). A ativação policlonal de linfócitos B é fenômeno mais exuberante na forma aguda e subaguda, e associa-se à hipergamaglobulinemia, ao aumento dos níveis de complexos imunes circulantes e à ativação do sistema complemento pela via clássica (MUNK *et al.*, 1992). Altos níveis séricos de IgG, IgE e IgA se correlacionam-se diretamente com maior gravidade da doença (BIAGIONI *et al.*, 1984). Há altos níveis de anticorpos séricos específicos para gp43 e gp70 nos pacientes com PCM. Tais fatos reforçaram a idéia da existência de resposta de linfócitos Th2, produtores de IL-4, IL-5 e IL-13, na PCM, relacionada com inibição das respostas protetoras por células Th1 e incapacidade do sistema imunitário de controlar a infecção (BENARD *et al.*, 1997).

A contenção da infecção por *P. brasiliensis* deve-se principalmente à ação microbicida de macrófagos e a formação de uma inflamação crônica granulomatosa. Em ambos os casos, IFN- γ e TNF- α contribuem de forma decisiva. A atividade fungicida de macrófagos, otimizada pela ativação com IFN- γ e TNF- α , tem sido atribuída à produção de NO pela enzima NO sintase induzível. A ativação dessa enzima parece ser decorrente não somente da ação sinérgica das citocinas IFN- γ e TNF- α , mas também de produtos liberados pelo próprio agente patogênico. Atribui-se ao NO papel essencial no controle da disseminação fúngica, por associar-se à atividade fungicida de macrófagos (NASCIMENTO *et al.*, 2002). Há indicações

de que a produção alta e persistente de NO inibe a produção de TNF- α , citocina chave na formação do granuloma por atrair e ativar macrófagos, que são acumulados localmente e diferenciam-se em células epitelióides. Menores níveis de TNF- α favorecem o agravamento das lesões pulmonares (NASCIMENTO *et al.*, 2002), enquanto a produção de TNF- α por macrófagos associa-se a resistência à infecção por *P. brasiliensis* (CALVI *et al.*, 2003b). Camundongos geneticamente deficientes do receptor para TNF- α são altamente susceptíveis à infecção por *P. brasiliensis* (SOUTO *et al.*, 2000).

A reação granulomatosa, predominante na PCM humana e experimental, desempenha importante papel na defesa do hospedeiro contra o fungo. Os granulomas são constituídos por células fagocíticas mononucleares, que sofrem transformação para células epitelióides e gigantes multinucleares, matriz extracelular organizada (KERR *et al.*, 1988a), além de linfócitos T e outras células (MOSCARDI-BACCHI *et al.*, 1989). A IL-10 e o NO podem ser importantes na regulação da formação do granuloma (DINIZ *et al.*, 2001). Pacientes com PCM aguda apresentam padrão da resposta granulomatosa difusa, que se associa à supressão de células T (DINIZ *et al.*, 1999). Alterações tímicas podem estar envolvidas no fenômeno de imunodepressão, freqüentemente associado à infecção por *P. brasiliensis* (SOUTO *et al.*, 2003).

1.3. Antígenos de *P. brasiliensis*

A complexidade antigênica de *P. brasiliensis* associado à pequena quantidade de estudos aprofundados sobre a identificação e o papel dos diversos antígenos no curso da infecção por esse fungo tornam esse campo ainda pouco explorado para determinação de alvos vacinais e de tratamento, bem como para o entendimento da biologia do fungo. Atualmente, com o seqüenciamento do genoma de diversos organismos patogênicos, vislumbra-se a identificação mais rápida de antígenos potencialmente promissores para

diagnóstico e vacinas (RACZNIAK *et al.*, 2001; MORA *et al.*, 2006). Além disso, os bancos de seqüências gerados possibilitam a identificação mais rápida de proteínas expressas em pequena quantidade, através de técnicas de alta sensibilidade e acurácia, como por exemplo a espectrometria de massa (CANAS *et al.*, 2006). Embora não se tenha ainda o seqüenciamento do genoma completo do *P. brasiliensis*, iniciativas de pesquisadores brasileiros têm levado ao seqüenciamento do genoma funcional do fungo, o que poderá contribuir para a compreensão do metabolismo geral e diferencial em micélio e levedura, do ciclo celular, da replicação, reparo e recombinação de DNA, biogênese de RNA, da maquinaria de tradução e destino das proteínas, da produção da parede celular, das enzimas produzidas, além da identificação da relação entre proteínas produzidas e virulência fúngica (ANDRADE *et al.*, 2005). A criação de um banco de dados completo das seqüências gênicas de *P. brasiliensis*, e conseqüentemente das seqüências protéicas, poderá auxiliar no preenchimento de uma das grandes lacunas que temos em relação a esse fungo, que é a falta de identificação de grande parte das proteínas estudadas até o momento.

Frações antigênicas mistas têm sido utilizadas em várias provas sorológicas, tais como: imunodifusão, contraímunoeletroforese, fixação do complemento, imunofluorescência indireta e em testes cutâneos de hipersensibilidade tardia, para o diagnóstico da PCM (DEL NEGRO *et al.*, 1991). O desenvolvimento de ensaios diagnósticos deve considerar que vários antígenos identificados em *P. brasiliensis*, de membrana ou secretados, são compartilhados por outros fungos patogênicos, como *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitides*, acarretando, em testes cutâneos e sorológicos, reações cruzadas com pacientes acometidos de outras micoses (ANDRIEU *et al.*, 1969).

Dentre os fatores próprios do fungo capazes de aumentar sua patogenicidade, são mencionados lipídeos, polissacarídeos e glicoproteínas (LOPES *et al.*, 1994; VICENTINI *et al.*, 1994). Embora haja diversas investigações sobre a identificação e/ou isolamento de

antígenos protéicos, ou mais precisamente, glicoproteínas de *P. brasiliensis*, indubitavelmente, a gp43 é a mais estudada dentre as glicoproteínas desse fungo. Além de ser a glicoproteína predominante em *P. brasiliensis*, a notoriedade dessas glicoproteína se deve principalmente ao fato de ser reconhecida por soro de 100% dos pacientes com PCM (TRAVASSOS *et al.*, 1995), sendo também aplicada ao teste de DTH em substituição a paracoccidioidina (SARAIVA *et al.*, 1996).

Vários estudos sobre o papel da gp43 têm demonstrado seu envolvimento na patogenicidade de *P. brasiliensis*. Verificou-se que esta glicoproteína elicita intensa produção de anticorpos e sua secreção e circulação *in vivo* como antígeno livre, ou complexado, podem inibir a atividade das células NK e induzir células supressoras. Além disso, está envolvida na adesão de *P. brasiliensis* aos macrófagos peritoneais murinos, fenômeno que leva à fagocitose (ALMEIDA *et al.*, 1998). POPI *e cols.* (2002) demonstraram que gp43 é capaz de promover a regulação negativa da linfoproliferação e da função de macrófagos peritoneais murinos, via receptores de manose, além de inibir a liberação de radicais livres e a atividade microbicida de macrófagos. Recentemente observou-se que gp43 purificada induz menor expressão de moléculas de MHC de classe II, bem como, de moléculas de adesão em células dendríticas de animais susceptíveis (FERREIRA e ALMEIDA, 2006).

Apesar de gp43 ser o antígeno mais estudado, outros antígenos, como proteínas de estresse de 70 kDa (hsp70) (FLOREZ *et al.*, 2003; BISIO *et al.*, 2005), hsp60 (IZACC *et al.*, 2001) e hsp87 (DIEZ *et al.*, 2002), bem como outras glicoproteínas vêm sendo descritas (PUCCIA *et al.*, 1986; PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2005; COLTRI *et al.*, 2006). Interessante notar que inúmeras proteínas ou glicoproteínas são secretadas por *P. brasiliensis* em cultura (exoantígenos – exoAgs), com massas moleculares que variam de 17 a 190kDa. Muitas dessas proteínas são compartilhadas por cepas do fungo, sendo reconhecidas,

em grau variável pelo soro de pacientes (PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2003). Cada um desses antígenos deveria ser estudado de modo a conhecer suas funções na célula fúngica.

Embora muitas proteínas e glicoconjugados do *P. brasiliensis* pareçam ser importantes para a definição da infecção, possivelmente aquelas que apresentam interação com a matriz extracelular do hospedeiro são cruciais na primeira etapa de colonização do fungo. KERR *e cols.*, em 1988, foram uns dos primeiros a sugerir que a formação de tecido fibrótico e rearranjo de matriz extracelular em granulomas de ratos infectados com *P. brasiliensis* era estimulado diretamente pela ação do fungo. Tais suposições começaram a ser comprovadas a partir da demonstração de que a adesão de *P. brasiliensis* à superfície de células epiteliais era mediada por laminina e gp43 (VICENTINI *et al.*, 1994). De fato, *P. brasiliensis* tratado com laminina previamente à infecção induziu uma PCM pulmonar menos grave, quando comparada aos animais infectados com fungos não tratados com laminina (ANDRE *et al.*, 2004), indicando um efeito inibitório do tratamento com laminina sobre a infectividade de *P. brasiliensis*.

Recentemente, outras proteínas ligantes de proteínas de matriz extracelular têm sido descritas. Dentre elas destaca-se uma lectina, descrita por nosso grupo, específica para o carboidrato N-acetil-glicosamina, denominada paracoccina. Essa lectina apresenta massa molecular de 70kDa e ligação à laminina dependente do sítio ligante de carboidrato. Paracoccina induz a síntese de TNF- α por macrófagos peritoneais, o que está diretamente associado com a alta produção de NO por essas células. Essas propriedades levaram a sugestão de que paracoccina tenha papel importante na patogênese da PCM (COLTRI *et al.*, 2006). Dentre as proteínas ligantes de matriz extracelular foram descritas também a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, presente na superfície celular de *P. brasiliensis* (BARBOSA *et al.*, 2006) e duas proteínas, purificadas e parcialmente caracterizadas, tendo massa molecular de 19 e 32kDa e ligação a fibrinogênio, laminina, fibronectina. Anticorpo

monoclonal contra a proteína de 32kDa foi capaz de inibir a ligação de conídios às proteínas de matriz extracelular de um modo dose-dependente, indicando ser essa proteína um potencial mediador fúngico da adesão inicial de *P. brasiliensis* (GONZALEZ *et al.*, 2005a; GONZALEZ *et al.*, 2005b). MENDES-GIANNINI *e cols.* (2006) mostraram que além de laminina, outros componentes de matriz extracelular se ligam à superfície de leveduras de *P. brasiliensis*, dentre eles o colágeno do tipo I, a fibronectina e o colágeno do tipo II. A ligação a colágeno do tipo I é decorrente da interação com as proteínas de 47 e 80kDa, enquanto fibronectina, similarmente ao que ocorre com laminina, se associa a gp43.

Estudos prévios de nosso grupo têm mostrado que lectinas — proteínas que apresenta ao menos um domínio que se liga específica e reversivelmente a carboidratos e que é destituído de atividade enzimática — oriundas de patógenos podem participar do processo infeccioso (LOURENCO *et al.*, 2001), além de reconhecer proteínas de matriz extracelular (COELHO-CASTELO *et al.*, 2002; COLTRI *et al.*, 2006). Nesses estudos sempre usávamos açúcares simples para a purificação das proteínas, o que poderia restringir em algumas situações a ligação de lectinas que têm afinidade baixa por monossacarídeos. Assim, nos estudos preliminares que fizemos com *P. brasiliensis*, optamos por glicoproteínas, cujos açúcares mais complexos poderiam mimetizar melhor as proteínas de matriz extracelular. A fetuína foi a glicoproteína de escolha por apresentar tanto *O*- quanto *N*-glicosilações, sendo essas últimas estruturas complexas de oligossacarídeos (NILSSON *et al.*, 1979). Os resultados iniciais indicaram que havia purificação de proteínas do fungo aparentemente ainda não descritas na literatura, embora houvesse evidências que nesse material não havia lectinas. Com a continuação desse estudo vislumbramos a possibilidade de melhor caracterizar a(s) proteína(s) ligantes de fetuína de *P. brasiliensis*, bem como, de usá-la como um tratamento terapêutico, a ser testado em PCM experimental murina.

OBJETIVO

Este trabalho visa caracterizar a(s) proteína(s) de *Paracoccidioides brasiliensis* ligantes de fetuína, bem como avaliar se a administração terapêutica dessa fração associada a um indutor de forte de resposta Th1 é capaz de modificar o curso da PCM experimental murina, levando à proteção de camundongos infectados.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados camundongos machos BALB/c, de 6 a 8 semanas de idade, provenientes do biotério de criação de camundongos isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

2. Cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis*

Para infecção dos camundongos foram utilizadas leveduras do isolado 18 de *P. brasiliensis* (Pb18), obtidas a partir do cultivo do fungo em meio YPD (1,5% de extrato levedura, 1,5% de peptona, 3% de glicose e 3% de ágar) por 7 a 14 dias, a 36°C. A escolha do isolado 18 foi baseada em sua alta virulência e capacidade de induzir reação granulomatosa (KASHINO *et al.*, 1985). A virulência dos isolados foi mantida através da inoculação periódica das leveduras em camundongos com posterior recuperação das mesmas em meio de cultura ágar-BHI. Em estudos comparativos da presença da fração ligante de fetuína em cepas de diferentes virulências, foram utilizadas Pb18 (altamente virulenta), cepa BAT (isolada de paciente do HCRP-USP), cepa 265 (baixa virulência). Esses dois outros isolados foram cultivados como descrito para Pb18. Todos os isolados foram gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Roberto Martinez (Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP).

3. Antígeno total de *P. brasiliensis* (PbAg)

O PbAg foi obtido a partir do rompimento das células fúngicas por vibração ultrassônica a 200W, por 1 minuto, em banho de gelo. Esse procedimento foi repetido várias vezes, até se obter um alto grau de ruptura das leveduras, o qual foi verificado através da análise microscópica da suspensão fúngica. A suspensão foi centrifugada a $7.000 \times g$ por 10min e o

sobrenadante retirado e filtrado. A dosagem protéica foi realizada pelo método de BCA (do inglês Bicinchoninic acid), conforme instruções do fabricante (Sigma Chemical Co.).

4. Cromatografia de afinidade

Amostras de antígeno total de *P. brasiliensis* foram aplicadas à coluna de agarose-fetuína (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), previamente equilibrada com tampão fosfato 20mM, pH 7,4. A resina foi lavada com o tampão de equilíbrio para remoção do material não adsorvido à coluna. O material adsorvido foi eluído pela adição de 1M de NaCl. Em alguns experimentos, antes da eluição com NaCl, pesquisou-se se açúcares causavam a eluição do material adsorvido. Nesses casos, fez-se eluição seqüencial com 0,4M de glicose, 0,4M de manose, 0,4M de galactose, 0,4M lactose e 1M de NaCl. Todos os procedimentos cromatográficos foram realizados em sistema cromatográfico automático FPLC (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), monitorado por absorbância em 280nm. O pool de frações ligantes à coluna foi submetido à ultradiafiltração em membrana YM-10 (Amicon® Division, W. R., Grace & Co. MA. USA) e denominada FBP (do inglês Fetuin Binding Proteins).

5. Análise de eletroforética e transferência de proteínas

As análises eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida a 10% e 12,5% (m/v) em condições dissociantes (SDS-PAGE), em sistema *Mini-Protean 3* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). As amostras de FBP foram ressuspensas em tampão de amostra [Tris-HCl a 0,5M, pH 6,5, contendo SDS a 2,5% (m/v), 2-mercaptoetanol a 2,5% e glicerol a 10% (v/v)], incubadas em banho maria a 100°C, por 3min e aplicadas no gel. As corridas eletroforéticas foram feitas em tampão contendo 24,8mM de Tris, 192mM de glicina e SDS a 0,1% (m/v), e tiveram duração aproximada de 40min (80-120mA, 200V). Marcadores protéicos de MM conhecidas foram usados como padrão de migração. Os géis

foram corados com prata, azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Pierce Chemical Co., Rockford, EUA) ou *Pro-Q Emerald 300 Glycoprotein Gel stain kit* (Molecular Probes, Eugene, OR). Marcadores protéicos com MM conhecidas foram usados como padrão de migração (BenchMark Protein Ladder - Invitrogen, Carlsbad, EUA).

A eletrotransferência dos componentes protéicos separados por SDS-PAGE para membranas de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham Bioscience) e PVDF (difluoreto de polivinileno) (ImobilonTM, Millipore, Bedford, USA) foi feita em sistema *Mini-Protean 3* (Bio-Rad Laboratories), em cuba contendo tampão CAPS a 10 mM, metanol 10%, pH 11, por 2h a temperatura ambiente (TA) (85-135mA, 150V).

6. Preparação do extrato de pulmão biotinilado

O pulmão de um camungongo Balb/c não infectado foi perfundido com PBS e homogeneizado em 10 ml de PBS contendo inibidores de protease (10 mM EDTA, 2 mM 2-ME, 0.3 mM PMSF, 1 mM benzamidine, and 3 μ M aprotinin). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de BCA. Para o processo de biotinilação, foi adicionada 74 μ l de uma solução aquosa contendo 10 μ g/ml de Sulfo-NHS-LC-Biotina (hexanoato de sulfosuccinamidil-6-biotinamida)(Pierce), a 1mg/ml de extrato de pulmão. Tal mistura foi mantida em repouso, em banho de gelo, por 2 horas. Finalmente, a biotina não conjugada foi removida com auxílio de um microconcentrador.

7. Caracterização da interação com matriz extracelular de pulmão

Membranas de nitrocelulose contendo FBP foram bloqueadas com PBS contendo Tween-20 0.05% (v/v) e gelatina 5% (p/v) (tampão de bloqueio) durante 2 horas a 37°C, a fim de se eliminar ligações inespecíficas. Foram colocadas para reagir, por 1 hora a 37°C, extrato

de pulmão biotilado (10 µg/ml) diluído em tampão de bloqueio. Após lavagens das membranas com Tween-20 0.05% (v/v) em PBS (tampão de lavagem), as fitas de nitrocelulose foram incubadas, por 30 minutos, com estreptoavidina conjugada a fosfatase alcalina diluída em tampão de bloqueio (1:4000). Após nova etapa de lavagens, a reação foi detectada com solução de BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato / azul de nitro tetrazólio) na concentração sugerida pelo fabricante. A reação foi detectada com BCIP/NBT.

8. Seqüenciamento protéico

8.1. Degradação de Edman

A membrana de PVDF contendo FBP foi corada com azul de Coomassie a 0,1% (Coomassie Brilliant Blue R-250, Pierce Chemical Co.), por 15 min, a TA, e descorarada com solução de metanol a 45% e ácido acético 7%. A banda referente à FBP foi recortada e submetida ao seqüenciamento de aminoácidos N-terminal pela degradação automática de Edman, em seqüenciador automático de proteína (Applied Biosystems Procise Sequencer - modelo 491, Perkin Elmer Corporation, Norwalk, EUA) (gentilmente seqüenciado pelo Prof. Dr. José César Rosa, do Centro de Química de Proteínas, FMRP, USP).

8.2. Espectometria de massa

Bandas da fração FBP foram seqüenciadas pelo Dr. Álvaro Acosta Serrano, da Universidade de Glasgow, no *Fingerprints Proteomics Facility* da School of Life Science, Universidade de Dundee, Escócia. Bandas de FBP foram recortadas do gel de poliacrilamida e digeridas com tripsina, como descrito por WILM *e cols.* (1996). Os géis contendo as proteínas foram cortados em pequenos fragmentos e lavados por 1 hora com 10mM NH₄HCO₃. As proteínas foram removidas por 30min a 60°C em 100 µL de ditiotreitol a 4 mM em 100 mM de NH₄HCO₃ a 4°C e alquiladas pela adição de 10 µL de 100mM de iodoacetamina. Após

30min de incubação em TA na ausência de luz, os fragmentos de géis foram lavados por 1h em 50% de acetonitrila em 10 mM NH_4HCO_3 , seguidos de redução em acetonitrila e centrifugação a vácuo. Aos fragmentos do gel, em banho de gelo, foi adicionado 25 mM de NH_4HCO_3 com 2 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ de tripsina modificada (Promega). Após 45min, o sobrenadante foi removido e o tampão adicionado até cobrir os fragmentos de géis que foram incubados por 18h a 37°C. Foram procedidas duas extrações consecutivas com 50 μL de 0,1% de ácido trifluoroacético em 60% de acetonitrila. Os digestos foram centrifugados a vácuo, seguido pelo tratamento com 5 μL de 0,1% de ácido trifluoroacético em 30% de acetonitrila. Os digestos foram analisados em espectrômetro de massa (Applied Biosystems). Para análise, as amostras foram aplicadas aos círculos desenhados na placa para análise em MALDI-TOF-MS, em volume de 2,5 μL . Após serem secas, o processo foi repetido mais quatro vezes, sendo 1 μL da matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinnâmico (5mg/mL de água:AcN/ ácido trifluoroacético a 0,1% [v/v] tamponado com 20mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) adicionada à placa. A matriz foi seca a T.A. e os digestos foram imediatamente analisados em espectrômetro de massa (MALDI-TOF-MS – 4700 Proteomics Analyser, Applied Biosystem, Foster City, EUA).

9. Determinação de viabilidade dos fungos

A viabilidade foi determinada pela técnica de diacetato de fluoresceína - brometo de etídio (CALICH *et al.*, 1979). Brevemente, 100 μL de uma suspensão de leveduras em solução salina tamponada com fosfato a 10mM, pH 7,2 (PBS) estéril foram misturados a uma solução contendo 100 μL de brometo de etídeo (50mg/mL – Sigma Chemical Co.) e 100 μL de diacetato de fluoresceína (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - Sigma Chemical Co.), preparadas no momento do uso. Essa suspensão foi incubada por 10min a 36°C, na ausência de luz. Após o período de incubação, a viabilidade das células fúngicas foi determinada em microscópio de fluorescência, sendo que aquelas que apresentaram coloração esverdeada foram consideradas

como formas vivas ou viáveis e aquelas que se mostraram avermelhadas foram consideradas mortas. Apenas as suspensões de leveduras com viabilidade superior a 90% foram utilizadas para infectar camundongos.

10. Infecção dos camundongos com leveduras de *P. brasiliensis*

Leveduras de Pb18 cultivadas conforme descrito anteriormente, foram dissociadas em solução de PBS estéril contendo pérolas de vidro (4mm de diâmetro) e ajustadas para concentração de 1×10^7 leveduras viáveis/mL, em PBS estéril. Cada camundongo foi inoculado endovenosamente com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis*, do isolado Pb18, contidas em 0,1mL de PBS.

11. Protocolo de tratamento da PCM experimental

Criamos protocolo de tratamento terapêutico, onde camundongos foram infectados com 1×10^6 leveduras da cepa Pb18 e mantidos por 21 dias para que a infecção se estabelecesse. Após esse período, os animais foram divididos em 3 grupos de acordo com o regime de tratamento. O grupo controle foi injetado, por via subcutânea, uma dose única de salina emulsificada com adjuvante incompleto de Freund (do inglês IFA – Incomplete Freund's Adjuvant). O segundo grupo foi injetado por via subcutânea uma dose única de salina emulsificada com adjuvante completo de Freund (do inglês CFA – Complete Freund's Adjuvant), este grupo foi chamado CFA, ao último grupo foi administrado por via subcutânea uma dose única de 25µg de FBP emulsificada com adjuvante completo de Freund, este grupo foi chamado CFA + FBP. Decorridos 30 dias do tratamento os animais dos 3 grupos foram mortos e tiveram seu sangue e órgãos coletados, conforme diagrama abaixo



12. Soro de animais infectados

Animais infectados tiveram seu sangue coletado 20 e 50 dias após infecção. O soro foi obtido através da centrifugação do sangue total coagulado, a $250 \times g$ por 5min, sendo então congelado e armazenado a -20°C , até o momento do uso.

13. Processamento dos órgãos

Animais infectados com *P. brasiliensis* foram mortos após 20 e 50 dias de infecção, e os pulmões, o fígado e o baço foram assepticamente retirados e pesados. Parte desses órgãos foram divulsionados em homogeneizador de tecidos tecido (Ultra-Turrax T25 Basic, IKA Works, Inc., Wilmington, USA) em frascos apropriados contendo 1mL de PBS estéril, enquanto outra parte foi fixada em formalina para análise histopatológica. Para determinar a recuperação de fungos, 100 μL do homogenato de cada um dos órgãos dos animais foram semeados, em duplicata, em placas de Petri contendo meio BHI-ágar enriquecido com 4% de soro bovino fetal inativado (Hyclone, Utah, USA) e 96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina (Invitrogen). As placas foram vedadas com filme plástico para evitar a secagem e mantidas a 36°C , por até 14 dias, para o crescimento das colônias. A recuperação de fungo nos órgãos foi avaliada a partir da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) aos 7 dias de cultivo; determinou-se o número de CFU por grama de órgão (CFU/g). Para a quantificação de citocinas nos órgãos o restante do homogenato foi centrifugado a $5.000 \times g$ por 10min. Os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20°C para ELISA. O nível de IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α e TGF- β foram determinados utilizando kits comerciais (OptEIA Set, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de citocinas foi determinada utilizando como referência uma curva padrão com diluição seriada na base dois, de citocinas recombinantes murinas.

14. Análise histopatológica

Fragmentos do pulmão, fígado e baço dos camundongos foram fixados em formalina 10% por 24h, desidratados, clarificados em xilol, embebidos em parafina e seccionados (5µm). Os cortes foram mantidos em estufa a 60°C para fixação e, após desparafinização em xilol e reidratação em concentrações decrescentes de álcool, foram corados com hematoxilina-eosina (HE), prata-metanamina de Grocott e picrosirius, para a detecção de infiltrado celular, do fungo e de colágeno e fibrose, respectivamente. Os cortes foram utilizados para análise histológica e as lesões granulomatosas foram analisadas por microscopia de luz (Eclipse E800, Nikon Instruments, Inc., Melville, EUA) e as imagens foram adquiridas com o auxílio de uma câmera digital Nikon DXM1200 (Nikon Instruments, Inc.), acoplada ao microscópio.

15. Análise morfométrica dos granulomas

Com o intuito de avaliar o número e a área dos granulomas presentes no tecido, a extensão da lesão, bem como quantificar a presença de infiltrado inflamatório, fungos e colágeno nos granulomas, as imagens adquiridas foram analisadas com o auxílio do programa ImageJ 1.37v (NIH, Bethesda, MD)

16. ELISA

16.1. Dosagem de citocinas

Placas de poliestireno de alta afinidade (Corning) foram sensibilizadas com 100µL/poço de anticorpo monoclonais específicos para cada citocina a ser dosada (anticorpo de captura), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6 por uma noite a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas com solução de PBS acrescido com 10% de soro bovino fetal inativado (Sigma Chemical Co.) (solução de bloqueio) durante 1h a TA. Aos poços das placas foram adicionados, em duplicata, as citocinas recombinantes (curva-padrão) e as amostras; as placas foram incubadas a TA durante 2h. Em seguida, foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween e foram adicionados os anticorpos secundários específicos para cada citocina conjugados com biotina (anticorpo de detecção) associados à avidina-peroxidase, na concentração recomendada pelo fabricante. As placas foram incubadas a TA por 1h. Após nova etapa de lavagem, foi adicionado solução reveladora contendo peróxido de hidrogênio e TMB (Pierce). As reações foram bloqueadas após 20min com ácido sulfúrico 2M e a leitura realizada a 450nm em leitor de microplacas (Power Wave X- Bio Tek Instruments, Inc.).

16.2. Dosagem de anticorpos séricos

Anticorpos específicos para os antígenos de *P. brasiliensis* foram quantificados no soro de animais infectados. Microplacas de poliestireno (Corning) foram recobertas com 100µL/poço de antígeno total de *P. brasiliensis* em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH9,6, em concentração de 50µg/mL. Após incubação por uma noite a 4°C, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% (v/v) de Tween 20 (Sigma Chemical Co.) (PBS-T) e incubadas com 200µL/poço de solução de PBS-T acrescido de gelatina a 3% (m/v) (PBS-T-gelatina 3%), durante 1h, a 37°C. A solução bloqueadora foi retirada e aos poços das placas

foram adicionados 100µL/poço das amostras dos soros dos animais infectados, coletados em diferentes períodos após infecção, em diluições que variaram de 1/30 a 1/2430, em PBS-T acrescido de 1% (m/v) de gelatina (PBS-T-gelatina 1%). As placas foram então incubadas a 37°C durante 2h e, após cinco lavagens com PBS-T, foram incubadas novamente com os anti-soro de cabra contra IgG1, IgG2b, IgA ou IgM de camundongo conjugado à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA), diluídos 1/5.000 em PBS-T-gelatina 1%, a 37°C por 1h. As placas foram lavadas, sendo a reação antígeno-anticorpo revelada pela adição de 100µL/poço de uma solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (Pierce Chemical Co.), na concentração sugerida pelo fabricante. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 2M e a leitura realizada a 450nm em leitor de microplacas (Power Wave X, Bio-Tek Instruments, Inc., Vermont, EUA).

16.3. Determinação de antígenos de *P. brasiliensis* circulantes

Microplacas de poliestireno de 96 poços (Corning) foram recobertas com 50µL de amostra de soro de camundongos infectados, diluído 1:4 (v/v) em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6. Após incubação por uma noite a 4°C, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas com 1% (m/v) de leite desnatado em PBS-T. Após a lavagem das placas, adicionaram-se alíquotas de 50µL/poço de um pool de soro de pacientes (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Roberto Martinez) contra antígeno total de *P. brasiliensis*, diluído 1/100 em 1% (m/v) de leite desnatado em PBS-T, sendo as placas mantidas a 37°C por 2h. As placas foram lavadas e aos poços adicionado 50µL de anticorpo anti-IgG humana conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Chemical Co.). Após a incubação das placas a 37°C por 1h, determinou-se a quantidade de conjugado ligado pela incubação com 50µL do substrato p-nitrofenil-fosfato (Sigma Chemical Co.) por poço, durante 30min a 37°C. A reação foi interrompida utilizando 1M NaOH e as absorbâncias foram determinadas a 405nm

em leitor de microplaca (Power Wave X). Como controle foi utilizado soro de animais não infectados.

17. Obtenção de células esplênicas e estimulação *in vitro*

Camundongos não infectados foram mortos, tiveram o baço removido assepticamente e divulsionado para a obtenção de células esplênicas totais. Essas células foram lavadas com meio RPMI incompleto por centrifugação a $250 \times g$ por 10min a 4°C e incubadas por 4min com tampão de lise (nove partes de cloreto de amônio a 0,16 M e uma parte de Tris-HCl a 0,17 M), a TA. As células foram novamente lavadas e ressuspensas para uma concentração de 1×10^6 células/ml, em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal. A suspensão celular, num volume de 100 μl /poço, foi distribuídas em triplicatas, em placas de cultura de 96 poços (Corning, Nova York, EUA) e cultivadas na presença de diferentes estímulos: ConA ($2\mu\text{g}/\text{mL}$), FBP ($5\mu\text{g}/\text{mL}$, $1\mu\text{g}/\text{mL}$ e $0,2\mu\text{g}/\text{mL}$), ou somente meio, durante 96h a 37°C , em estufa com atmosfera umidificada e 5% de CO_2 . Para a análise de citocinas *in vitro* o sobrenadante de 48h de estímulo com FBP ($5\mu\text{g}/\text{mL}$) foi coletado e armazenado a -80°C , para posterior dosagem de citocinas pelo método de ELISA, utilizando kits comerciais (OptEIA Set, BD Biosciences Pharmingen), de acordo com as instruções do fabricante.

18. Ensaio de proliferação celular com CFSE

Camundongos não infectados foram mortos, tiveram o baço removido assepticamente e divulsionado para a obtenção de células esplênicas totais. Essas células foram lavadas com meio RPMI incompleto por centrifugação a $250 \times g$ por 10min a 4°C e incubadas por 4min com tampão de lise (nove partes de cloreto de amônio a 0,16 M e uma parte de Tris-HCl a 0,17 M), a TA. As células foram novamente lavadas e ressuspensas para concentração de 1×10^6 células/ml de PBS estéril e, em seguida, marcadas com Carboxifluoresceína diacetato

succinimidil éster (CFSE) (Molecular Probes, Eugene, OR) em concentração final de $1,25\mu\text{M}$. A solução foi incubada a temperatura ambiente por 8 minutos e então as células foram lavadas com PBS estéril. Após este procedimento, as células foram cultivadas na concentração de 2×10^6 células por poço em placa de 48 poços, na presença de diferentes estímulos: ConA ($2\mu\text{g/mL}$), FBP ($5\mu\text{g/mL}$), ou somente meio, durante 48h a 37°C , em estufa com atmosfera umidificada e 5% de CO_2 . Em seguida, as células foram incubadas com $0,5\mu\text{g}$ de anticorpo monoclonal “Fc block” por 45 minutos, então foi adicionado $0,5\mu\text{g}$ por 5×10^5 células de anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD19 conjugados a PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) por 1h a temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e adquiridas em FACSSort (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ). As análises foram feitas usando o programa FCS Express 2.0 (DeNovo Software, Ontario, Canada).

19. Citometria de fluxo

A análise da expressão de marcadores de superfície, no intuito de caracterizar a população de linfócitos T e B, bem como subpopulações T $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ e T $\text{CD8}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$, foi realizada em células recuperadas do baço de camundongos previamente tratados com IFA (controle), CFA ou FBP por via subcutânea. Foi caracterizada a expressão das seguintes moléculas: CD4, CD8, CD19, CD25, CD28 e Foxp3. Em geral, as células foram incubadas com $0,5\mu\text{g}$ de anticorpo monoclonal “Fc block” por 45 minutos. Em seguida, foram adicionados $0,5\mu\text{g}$ por 10^6 células de anticorpos monoclonais conjugados a FITC, PE e PE-Cy5 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) por 1h a temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e adquiridas em FACSSort (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ). As análises foram feitas usando o programa FCS Express 2.0 (DeNovo Software, Ontario, Canada).

20. Análise estatística

A determinação estatística das diferenças entre as médias dos grupos experimentais foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey, utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes.

RESULTADOS

1. Purificação e caracterização das proteínas ligantes de fetuína (FBP)

A fim de identificar proteínas as quais possam desempenhar um papel importante na interação entre o *P. brasiliensis* e o hospedeiro, utilizamos a cromatografia de afinidade em coluna contendo fetuína imobilizada. As amostras de antígenos totais de *P. brasiliensis* (PbAg) usadas nesse procedimento foram obtidas através da sonicação de leveduras. O material adsorvido à coluna e eluído com tampão contendo 1M de NaCl (Figura 1) foi denominado FBP, apresentando rendimento aproximado de 12% do material aplicado, podendo variar um pouco entre as preparações.

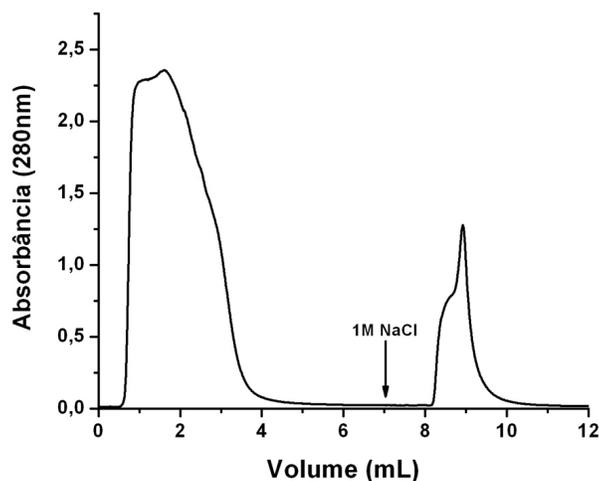


Figura 1. *P. brasiliensis* apresenta fração ligantes de fetuína.

PbAg foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de fetuína imobilizada, sendo retirado o material não adsorvido à coluna com tampão fosfato 20mM, pH 7,4. O material adsorvido à coluna foi eluído com solução de NaCl a 1M. A corrida foi feita em sistema FPLC e monitorada em absorvância a 280nm. O material adsorvido e eluído com NaCl corresponde a 12% do material recuperado.

Tendo em mãos a FBP purificada, investigamos se havia proteínas com natureza lectínica nessa fração, o que seria esperado, já que fetuína é proteína altamente glicosilada. Realizamos então ensaios de hemaglutinação com FBP, porém não observamos nenhuma atividade hemaglutinante (dados não mostrados). A possibilidade de termos uma lectina não foi descartada, uma vez que certas lectinas apresentam apenas um único domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), e dessa forma, não aglutinam células. Para tirarmos essa dúvida realizamos uma nova purificação de FBP e realizamos uma eluição sequencial com 0,4M de glicose, 0,4M de manose, 0,4M de galactose, 0,4M de lactose e 1M de NaCl (Figura 2). A ligação de FBP à coluna se manteve mesmo com essas concentrações altas dos açúcares testados, o que aumentou os indícios de que não há proteínas ligantes de carboidratos na fração FBP.

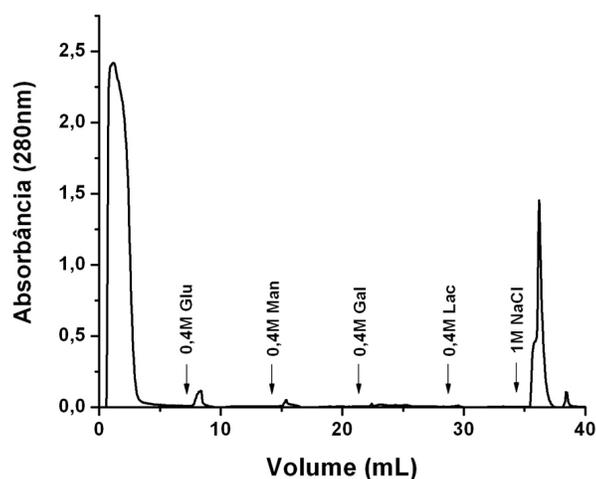


Figura 2. Fração ligante de fetuína não é eluído com açúcares diversos.

PbAg foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de fetuína imobilizada, como descrito na Figura 1. O material adsorvido à coluna foi submetido à eluição sequencial com 0,4M de glicose (Glu), 0,4M de manose (Man), 0,4M de galactose (Gal), 0,4M de lactose (Lac) e 1M de NaCl. A corrida foi feita em sistema FPLC e monitorada em absorvância a 280nm. As proteínas retidas não apresentaram afinidade por nenhum açúcar testado, sendo eluídas apenas com 1M de NaCl.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, para caracterizar a FBP, testamos o efeito de íons divalentes no perfil de eluição da proteína (Figura 3). Para tanto, incubamos amostras de PbAg com 10mM de EDTA, o que resultou na inibição da interação entre FBP-fetuína, sugerindo que essa interação é dependente de cátions divalentes. No entanto, quando amostras de PbAg foram incubadas com 10mM de EGTA, um quelante específico para íons Ca^{2+} , não houve alteração no perfil de eluição da FBP, demonstrando que a interação FBP-fetuína não é dependente de cálcio. Tentando estabelecer qual íon seria necessário para a interação, realizamos experimento onde amostras de PbAg eram incubadas com 10mM de EDTA e posteriormente com soluções de MgCl_2 , MnCl_2 , CuCl_2 e CaCl_2 tendo concentração final de 20mM desses íons. Observamos a precipitação do material quando acrescidos de qualquer um desses íons, sendo o mesmo observado quando acrescentamos esses íons a FBP purificada (dados não mostrados). Desta maneira fomos incapazes de determinar qual o íon importante para a interação FBP-fetuína.

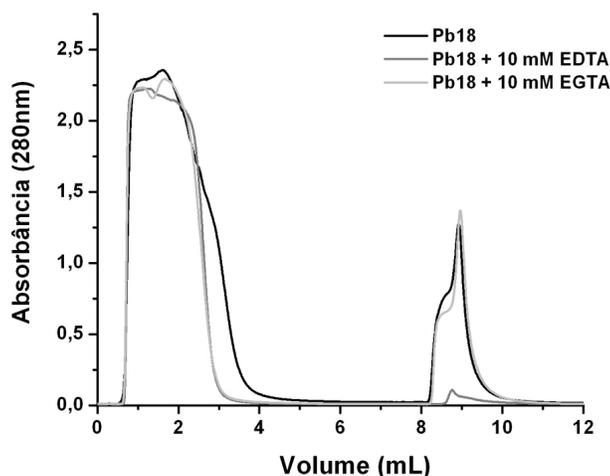


Figura 3. Efeito de quelantes de cátions divalentes no perfil de eluição de FBP.

PbAg foi incubado ou não com EDTA ou EGTA e submetido à cromatografia de afinidade em coluna de fetuína imobilizada, como descrito na Figura 1. Observou-se que EDTA, mas não EGTA, foi capaz de inibir a interação das proteínas com a agarose-fetuína.

Aventamos a hipótese de que FBP poderia ser enzima, no caso metaloproteínas. Para verificarmos essa hipótese realizamos um zimograma, porém não foi observada nenhuma atividade enzimática por parte da FBP (dados não mostrados).

Para analisar a homogeneidade da preparação FBP e caracterizá-la quanto à massa molecular de seus componentes, realizou-se análise eletroforética da amostra purificada em gel 12% , a qual revelou um perfil contendo uma banda majoritária de 60kDa e cerca de 4 bandas minoritárias de 50, 35, 24 e 14kDa. (Figura 4).

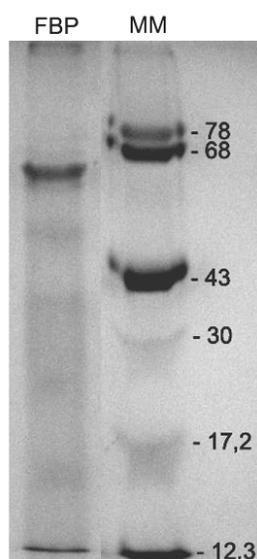


Figura 4. SDS-PAGE (12%) de FBP.

As amostras foram submetidas a tratamento redutor com mercaptoetanol. O gel foi corado pelo método da prata. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas [ovotresferina (78kDa), albumina (68kDa), ovalbumina (43kDa), anidrase carbônica (30kDa), mioglobulina (17,2kDa) e citocromo C (12,3kDa)] está indicada na figura.

Para determinarmos se essas proteínas de FBP eram glicosiladas, fizemos um SDS-PAGE de FBP e coramos o gel com *Pro-Q Emerald 300 Glycoprotein Gel stain kit*, sendo esse mesmo gel corado por prata para evidenciar a presença das bandas (Figura 5). O fato de observarmos proteínas de FBP no gel corado pela prata (gel 2) e nenhuma marcação no gel corado para glicoproteínas, foi sugestivo de que nenhuma proteína de FBP é glicosilada.

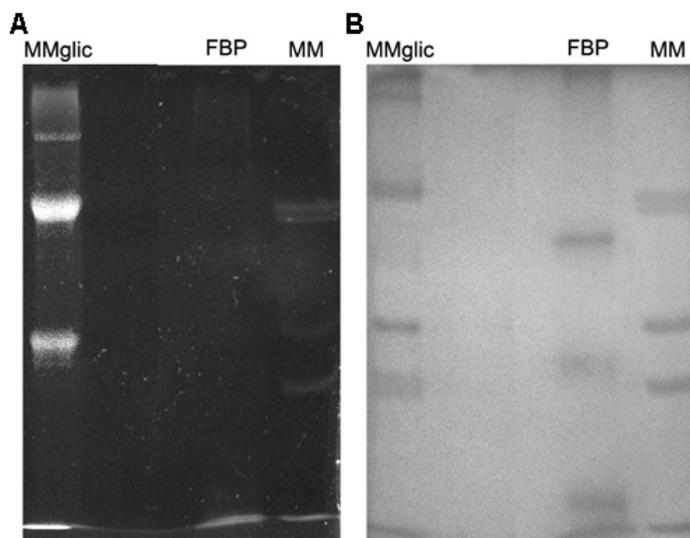


Figura 5. Determinação de glicosilação das proteínas de FBP.

As amostras de FBP foram submetidas a tratamento redutor com mercaptoetanol e submetidas à SDS-PAGE. O gel foi corado com *Pro-Q Emerald 300 glycoprotein gel stain kit* (A), sendo posteriormente corado pelo método da prata (B). MMglic - contém uma mistura de marcadores glicosilados [α 2-macroglobulina (180 kDa), glucose oxidase (82 kDa), glycoproteína ácida α 1 (42 kDa) e avidina (18 kDa)] e não glicosiladas [fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa) and anidrase carbonica (29 kDa)], FBP – fração ligante de fetuína e MM - proteínas com massas moleculares conhecidas [ovotresferina (78kDa), albumina (68kDa), ovalbumina (43kDa), anidrase carbônica (30kDa) e mioglobulina (17,2kDa)].

P. brasiliensis possui cepas de virulência variada, tais como a cepa Pb18 (altamente virulenta), cepa BAT (isolada de paciente do HCRP-USP), cepa 265 (baixa virulência). Com intuito de se correlacionar FBP e a virulência do fungo, aplicamos 1mg de PbAg de uma das três cepas de *P. brasiliensis* descritas acima, purificamos FBP por cromatografia de afinidade e aplicamos à SDS-PAGE. Como mostrado na Figura 6, a cepa Pb18 apresentou maior quantidade de FBP, seguido por BAT. A cepa 265 (avirulenta) apresentou quantidade extremamente pequena de FBP quando comparada às outras duas cepas. Esses resultados sugerem haver associação direta entre a quantidade de FBP e virulência das cepas de *P. brasiliensis*.

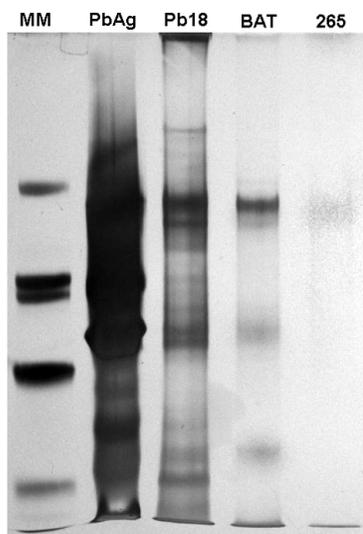


Figura 6. SDS-PAGE das FBPs obtidas de três isolados de *P. brasiliensis*.

Amostras de 1mg de PbAg das cepas Pb18, BAT e 265 foram usadas para purificação de FBP. As amostras de FBP foram submetidas a tratamento redutor com mercaptoetanol e submetidas à SDS-PAGE. O gel foi corado pelo método da prata. MM se refere às proteínas com massas moleculares conhecidas usadas como marcador molecular, PbAg foi obtido da cepa Pb18, enquanto Pb18, BAT e 265 se referem as cepas a partir das quais as FBPs foram purificadas. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas [albumina (68kDa), ovalbumina (45kDa), quimiotripsinogênio A (25kDa) e ribonuclease A (13,7kDa)] está indicada na figura.

Com base na expressão diferencial de FBP nas cepas analisadas, aventamos a hipótese de que FBP desempenhe possível papel na adesão do fungo. No intento de se evidenciar a interação da FBP com a matriz extracelular de pulmão, amostras de FBP foram transferida para membrana de nitrocelulose e incubadas com matriz extracelular biotinilada. Como observado na Figura 7, proteína de 60kDa de FBP interage com matriz extracelular, podendo desempenhar possível papel na adesão do fungo e constituir um fator de virulência.

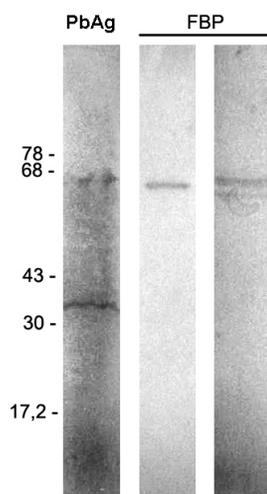


Figura 7. Immunoblotting das preparações FBP incubadas com matriz extracelular de pulmão biotilada.

Amostras de FBP e PbAg (EB) foram separadas em SDS-PAGE 12,5% e transferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com matriz extracelular de pulmão biotilada, sendo a posteriormente incubadas com avidina-peroxidase. As reações foram reveladas com DAB. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (expressa em kDa) está indicada na figura.

Tencionando-se identificar os constituintes protéicos de FBP, transferimos amostras separadas em SDS-PAGE para membrana de PVDF e submetemos todas as bandas ao seqüenciamento de aminoácidos. Não foi obtida seqüência de nenhuma dessas proteínas (dados não mostrados). Esse resultado nos fez ponderar sobre a possibilidade da extremidade N-terminal dessas proteínas estarem bloqueadas ou desse método não apresentar sensibilidade suficiente para detecção dessa quantidade de material que dispúnhamos. Por essa razão, submetemos bandas das proteínas de 60, 50 e 14kDa à digestão com tripsina para serem analisadas em espectrômetro de massa (MALDI-TOF-MS). A ausência de uma banco contendo as seqüências gênicas do *P. brasiliensis* limitou a nossa análise. A banda de 50kDa não gerou pareamento significativo com nenhuma proteína depositada em banco de dados de seqüências de fungos ou de todos os organismos cujas seqüências já estão depositadas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). A análise dos digestos da proteína de 60kDa gerou

similaridade com as proteínas quitina sintetase 2, CaaX prenil protease e glucana sintetase, enquanto os digestos da proteína de 14kDa geraram similaridade com as proteínas de citocromo. A identificação dessas proteínas poderão abrir caminho para um estudo mais detalhado do papel dessas moléculas como fator de virulência de *P. brasiliensis*.

Os resultados obtidos nos motivaram a investigar a utilização de FBP como alvo para terapia de PCM.

2. FBP induz supressão de resposta imunitária na PCM experimental

Após a caracterização bioquímica, passamos a avaliar a FBP como alvo terapêutico na PCM. Sabendo-se que as respostas Th1 são protetoras em PCM, aventamos a hipótese que esse padrão de resposta dirigido para FBP pudesse levar a um efeito terapêutico na PCM.

Para testar tal hipótese, tratamos três grupos de camundongos previamente infectados (21 dias antes) com a cepa Pb18 com salina emulsificada em IFA (controle negativo), salina emulsificada em CFA (controle do adjuvante) e FBP emulsificada em CFA (CFA+FBP). A fim de se avaliar o regime de tratamento utilizado e o impacto no controle da infecção, os animais foram pesados a cada cinco dias desde o momento da infecção até serem mortos (Figura 8). Embora os resultados não sejam estatisticamente significativos, podemos notar que os animais do grupo CFA continuam a ganhar peso, os do grupo CFA + FBP parecem ter estabilizado, enquanto os animais do grupo controle tendem a ter a redução de peso. O ganho de peso pode ser correlacionado com um bom prognóstico na PCM.

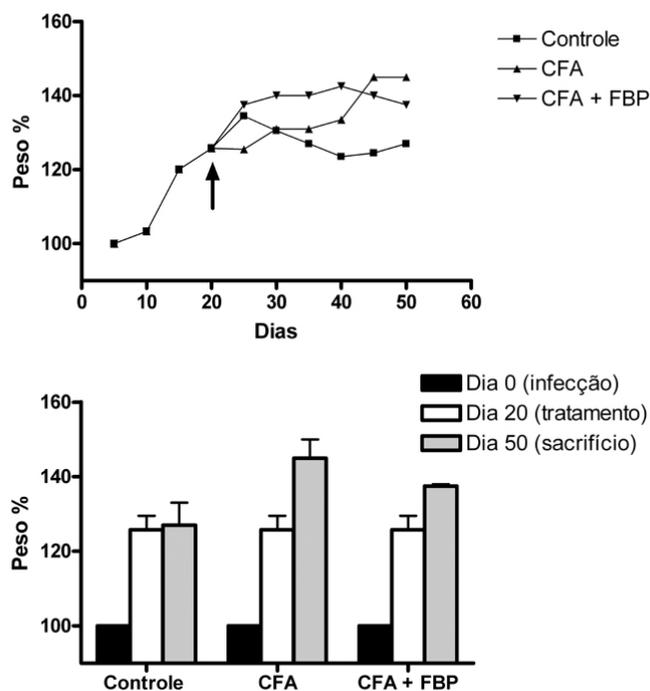


Figura 8. Monitoramento do peso corpóreo dos camundongos infectados e submetidos aos diferentes tratamentos.

Camundongos foram infectados com 1×10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*, sendo que 21 dias após a infecção foram tratados com salina emulsificada em IFA (controle) ou em CFA (CFA), ou FBP emulsificada em CFA. Durante os 50 dias de infecção, os animais tiveram seu peso monitorado de cinco em cinco dias.

Os três grupos experimentais foram então analisados quanto à infecção e para facilitar o entendimento dos resultados que virão a seguir dividiremos as análises por órgão.

2.1. Análise do pulmão dos animais infectados por *P. brasiliensis*

Com o intuito de observar a capacidade em conter o crescimento e a proliferação fúngica, analisou-se a quantidade de CFU recuperada do pulmão dos diversos grupos de tratamento. Como mostrado na figura 9, o grupo controle e o grupo CFA + FBP não conseguiram controlar o crescimento do fungo. Observamos nestes dois grupos um aumento da carga fúngica se comparado ao dia do início do tratamento. Por outro lado, o grupo CFA

foi capaz de conter a proliferação do fungo e reduzir em mais de 99% a carga fúngica se comparado ao grupo controle. A discrepância dos resultados entre os grupos CFA e CFA + FBP sugerem que FBP teve efeito supressor, impedindo o controle da proliferação do fungo.

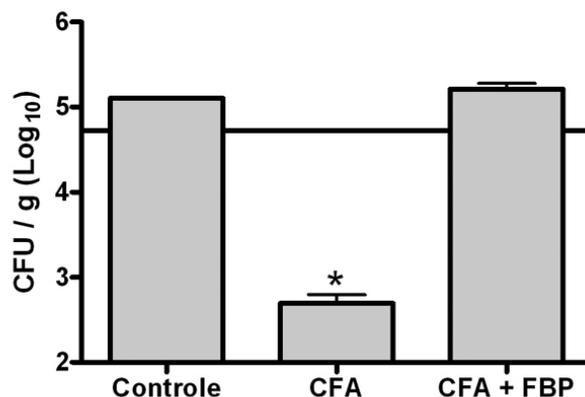


Figura 9. FBP reverte a diminuição de CFU induzida por CFA.

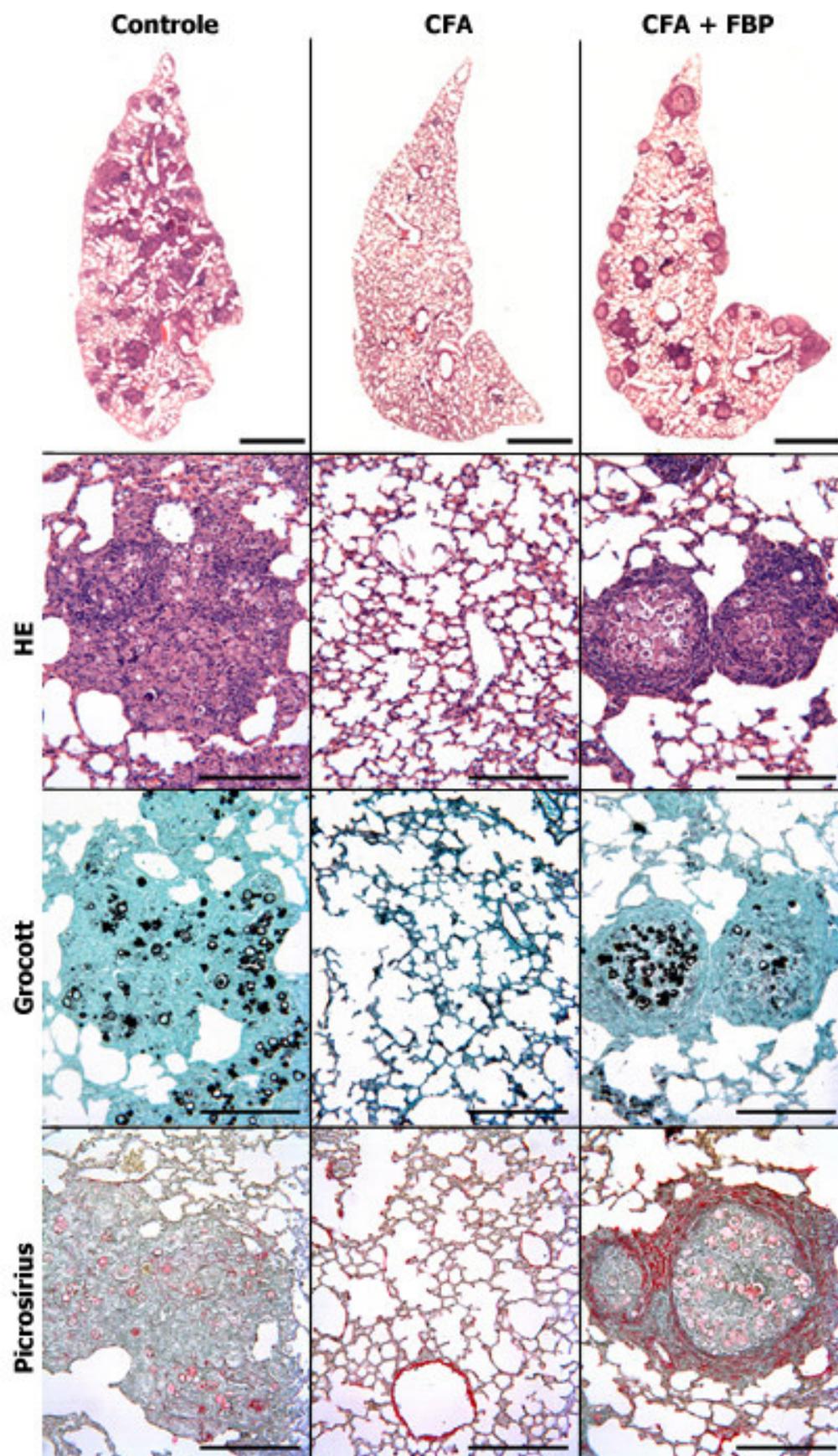
Camundongos foram infectados com 1×10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Aos 21 dias de infecção foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA e CFA + FBP. Após 30 dias do tratamento, os animais foram mortos e fragmentos do pulmão foram pesados, fracionados e o número de CFU analisado. A linha horizontal representa o número de CFU/g de tecido dos animais no dia do início do tratamento (21 dias de infecção). As barras representam as médias \pm SEM das CFU. * $p < 0,05$ em relação às CFU dos animais no início do tratamento, animais controle e CFA + FBP.

Observando a análise histológica do pulmão dos diversos grupos (Figura 10), podemos verificar maior comprometimento pulmonar dos animais do grupo controle com a presença de granulomas epitelióides maduros, com limites bem definidos, onde se detectou a presença de linfócitos e macrófagos ao redor, além de leveduras na porção central, também foi detectada a presença de polimorfonucleares na lesão (Figura 10a, d, g e j). No grupo tratado com CFA não fomos capazes de achar nenhuma estrutura granulomatosa, ocorrendo apenas leve espessamento dos septos alveolares, indicando que o animal tenha eliminado eficientemente o fungo, com recuperação completa das áreas atingidas pelo fungo (Figura 10b, e, h e k). O

grupo tratado com CFA + FBP apresentou granulomas muito bem estruturados e compactos, com grande quantidade de fungos em seu interior e presença de infiltrado inflamatório reduzido (Figura 10c, f, i e l).

A análise morfométrica do tecido indicou maior área de lesão e infiltrado celular no grupo controle se comparado ao tratado com CFA + FBP, porém foi detectada uma maior quantidade de fungos e deposição de colágeno no grupo CFA + FBP (Figura 11).

Avaliamos a produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α e TGF- β no sobrenadante do macerado de pulmão de animais infectados após os tratamentos. Observou-se baixa produção de todas as citocinas no pulmão obtido dos animais do grupo controle, resultado condizente com o estado de supressão desses animais. Os animais do grupo CFA produziram quantidades elevadas de citocinas IL-12, IFN- γ e TNF- α (Figura 12A, C e E), porém também foram capazes de produzir níveis significativos de IL-4 e IL-10 (Figura 12B e D), demonstrando que o tratamento foi eficaz em quebrar o estado de anergia em que se encontravam. Já os animais do grupo CFA + FBP produziram citocinas nos mesmos níveis do grupo controle com exceção da citocina TGF- β que teve uma elevada produção (Figura 12F). Esses resultados são sugestivos de que FBP é capaz de suprimir a produção de citocinas induzida por CFA por meio do aumento na produção de TGF- β .



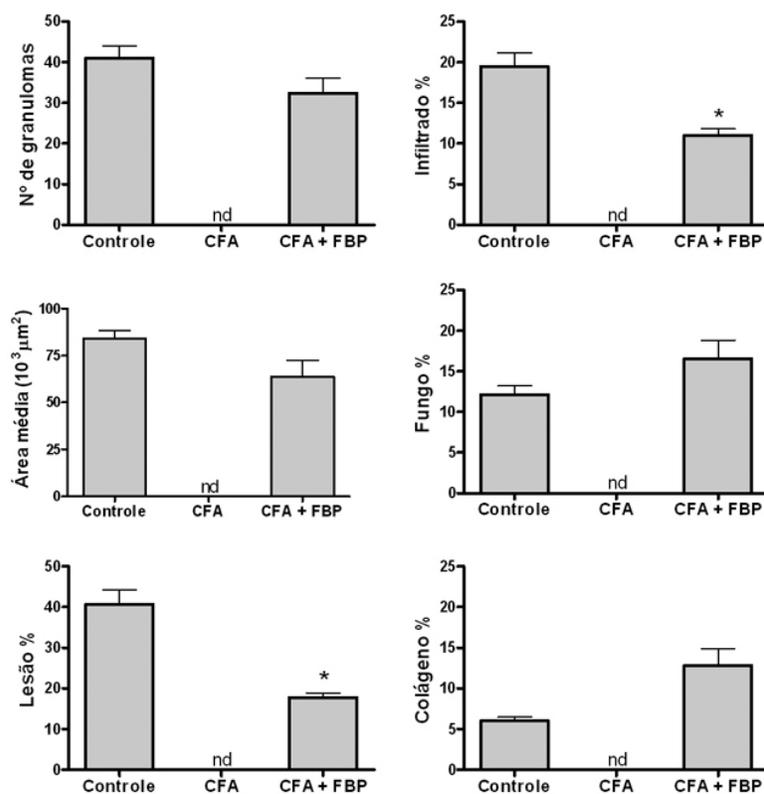


Figura 11. Análise morfométrica das secções de pulmão de camundongos infectados por *P. brasiliensis*, 30 dias após o tratamento.

Camundongos foram infectados por via intravenosa com 1×10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Aos 21 dias de infecção foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA e CFA + FBP. Após 30 dias, fragmentos do pulmão foram colhidos e processados para análise histológica. Através do uso do programa ImagePro, as imagens foram capturadas, copiadas e transformadas em leitura digital, sendo analisadas no programa ImageJ quanto ao número de granuloma, área média dos granulomas, lesão pulmonar e presença de infiltrado, fungos e colágeno no granuloma. As barras representam a médias \pm SEM. * $p < 0,05$ em relação ao animal controle. nd – não detectado.

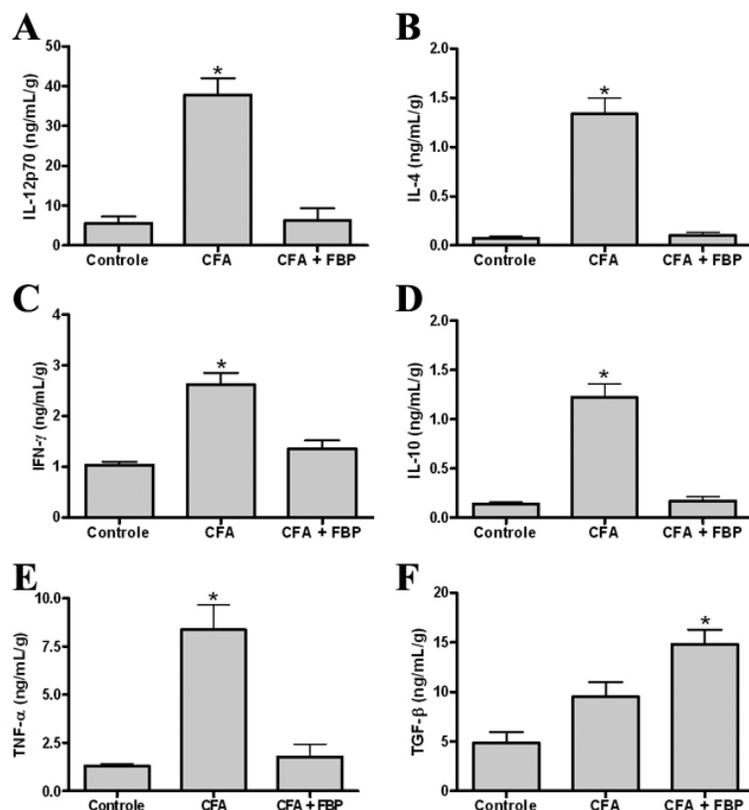


Figura 12. Detecção de citocinas no pulmão de camundongos infectados por *P. brasiliensis*, 30 dias após o tratamento.

Camundongos foram infectados por via intravenosa com 1×10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Aos 21 dias de infecção foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA e CFA + FBP. Após 30 dias, os animais foram mortos, tendo seus pulmões retirados, pesados e homogeneizados em PBS. Após a homogeneização, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante colhido para dosagem das citocinas pelo método de ELISA. As barras representam as médias \pm SEM das concentrações de citocinas de três animais em duplicata.

* $p < 0,05$ em relação ao animal controle.

Visando esclarecer quem seria o responsável pela produção da citocina TGF- β , realizamos um ensaio de imunohistoquímica do tecido pulmonar. Como mostrado na figura 13, as células responsáveis pela produção de TGF- β dos animais tratados com CFA + FBP foram as células do próprio epitélio pulmonar (Figura 13b), indicando que FBP de alguma

maneira estimula o epitélio pulmonar a produzir TGF- β suprimindo a produção de outras citocinas.

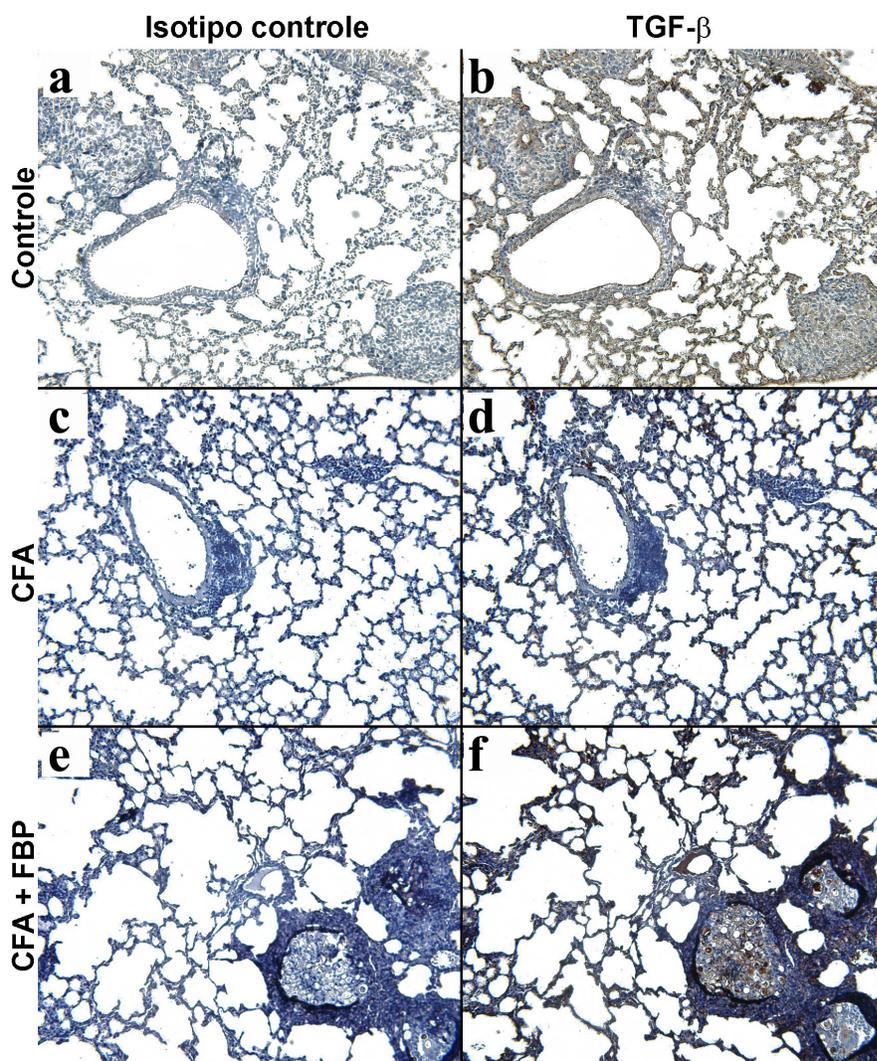


Figura 13. Expressão de TGF- β no tecido pulmonar de camundongos infectados por *P. brasiliensis*, 30 dias após o tratamento.

Camundongos foram infectados por via intravenosa com 1×10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Aos 21 dias de infecção foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA e CFA + FBP. Após 30 dias, fragmentos do pulmão foram colhidos e processados para análise imunohistoquímica para detecção de TGF- β . Nota-se imunoreatividade positiva marrom. Método de detecção: avidina biotina-peroxidase. Revelação: diaminobenzidina (DAB).

2.2. Análise do fígado dos animais infectados por *P. brasiliensis*

Para se determinar a quantidade de fungos no fígado, a fim de melhor caracterizar a capacidade em conter o crescimento do fungo, analisaram-se as CFU recuperadas do fígado dos diversos grupos de tratamento (Figura 14). O grupo controle não conseguiu eliminar os fungos presentes no fígado, bem como o grupo CFA + FBP. Observamos nestes dois grupos grande quantidade de fungos recuperados. Ao contrário dos observado nesses grupos, não houve a formação de colônias no grupo CFA, demonstrando que esse foi eficiente em controlar a disseminação e eliminar os fungos presentes. Novamente, a discrepância dos resultados entre os grupos CFA e CFA + FBP reforça a hipótese de que FBP tem um efeito imunossupressor sobre os animais.

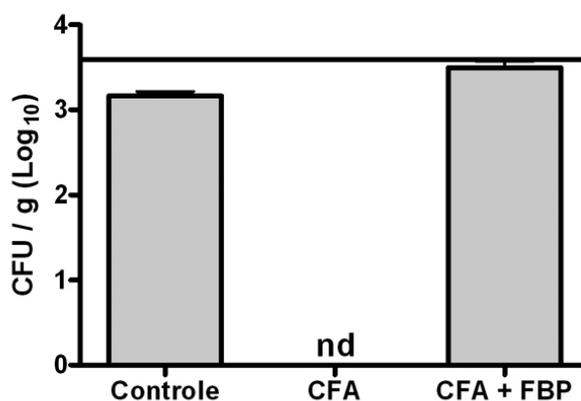


Figura 14. Quantificação de CFU no fígado de animais infectados

Camundongos foram infectados com 1×10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Aos 21 dias de infecção foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA e CFA + FBP. Após 30 dias do tratamento, os animais foram mortos e fragmentos do fígado foram pesados, fracionados e o número de CFU analisado. A linha horizontal representa o número de CFU dos animais no dia do início do tratamento (21 dias de infecção). As barras representam as médias \pm SEM das unidades formadoras de colônia. nd – não detectável.

Observando a análise histológica do fígado dos diversos grupos (Figura 15), podemos verificar um maior comprometimento hepático dos animais do grupo controle com a presença de muitos granulomas, com limites bem definidos e presença de fungos viáveis. No grupo tratado com CFA não fomos capazes de achar nenhuma estrutura granulomatosa, indicando que o animal foi capaz de eliminar o fungo eficientemente; também não observamos fibrose hepática nesses animais. O grupo tratado com CFA + FBP apresentou granulomas muito bem estruturados, com alto grau de fibrose circunscrevendo o granuloma, além de leveduras na porção central.

Avaliamos a produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α e TGF- β no macerado de fígado de animais infectados após os tratamentos (Figura16). Não houve diferença estatística na produção de citocinas, excetuando a maior produção de IL-10 nos animais do grupo controle e CFA + FBP. Cabe ressaltar que no fígado dos animais do grupo CFA não existiam fungos, e um padrão de resposta fortemente Th1, com altos títulos de IL-12 e IFN- γ , e baixos títulos de IL-4 e IL-10. Não foram detectados níveis de TGF- β no fígado desse grupo de animais.

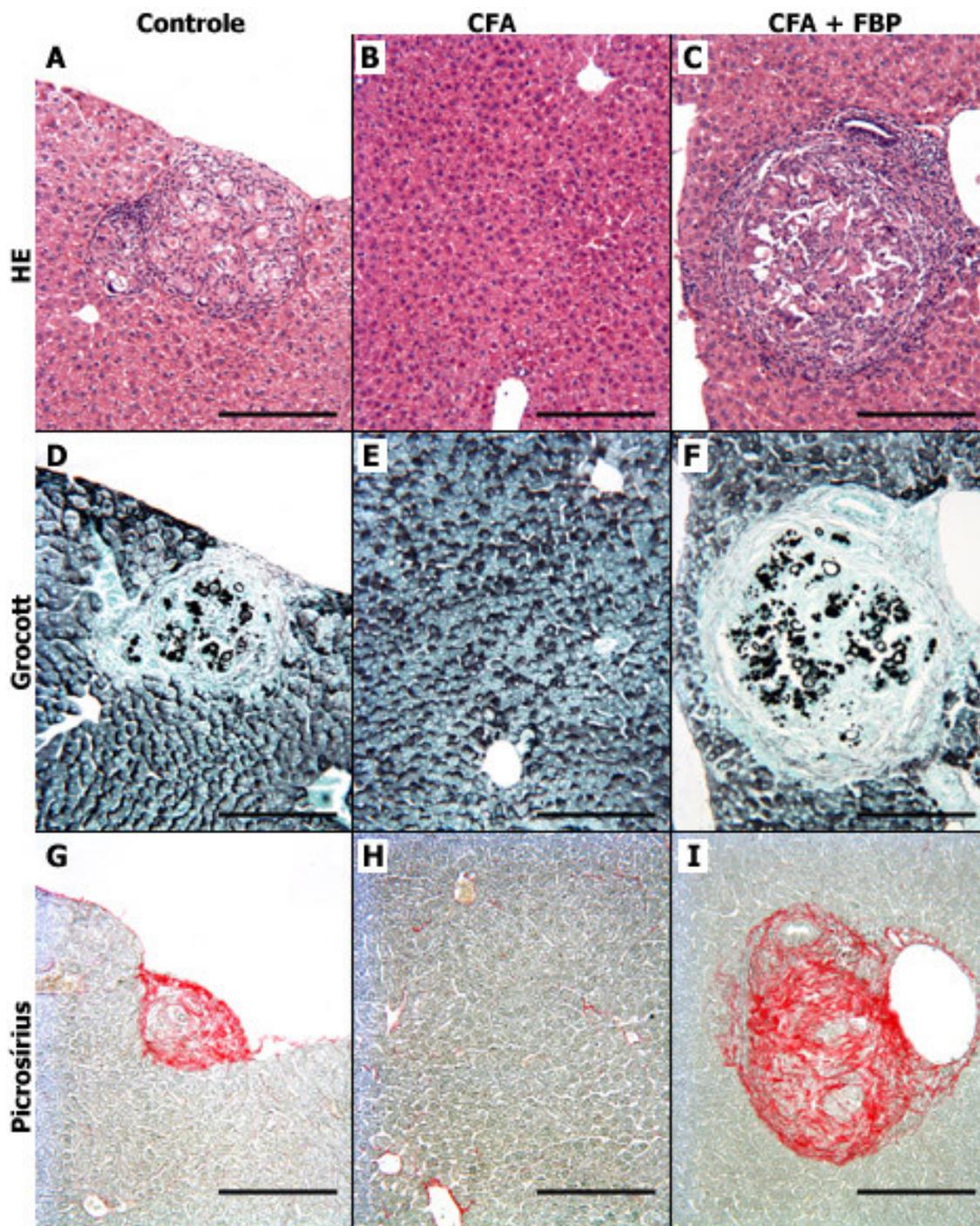


Figura 15. Análise histológica das secções de fígado de camundongos infectados por *P. brasiliensis*, 30 dias após o tratamento.

Camundongos foram infectados por via intravenosa com 1×10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Aos 21 dias de infecção foram submetidos a tratamento com IFA (controle) (A, D e G), CFA (B, E e H) e CFA + FBP (C, F e I). Após 30 dias, fragmentos do fígado foram colhidos e processados para análise histológica. Observa-se a presença de granulomas com leveduras viáveis em seu interior nos animais tratados com IFA (A, D e G) e CFA + FBP (C, F e I). Ausência de granulomas nos tratados com CFA (B, E e H). Barras = 0,2 mm.

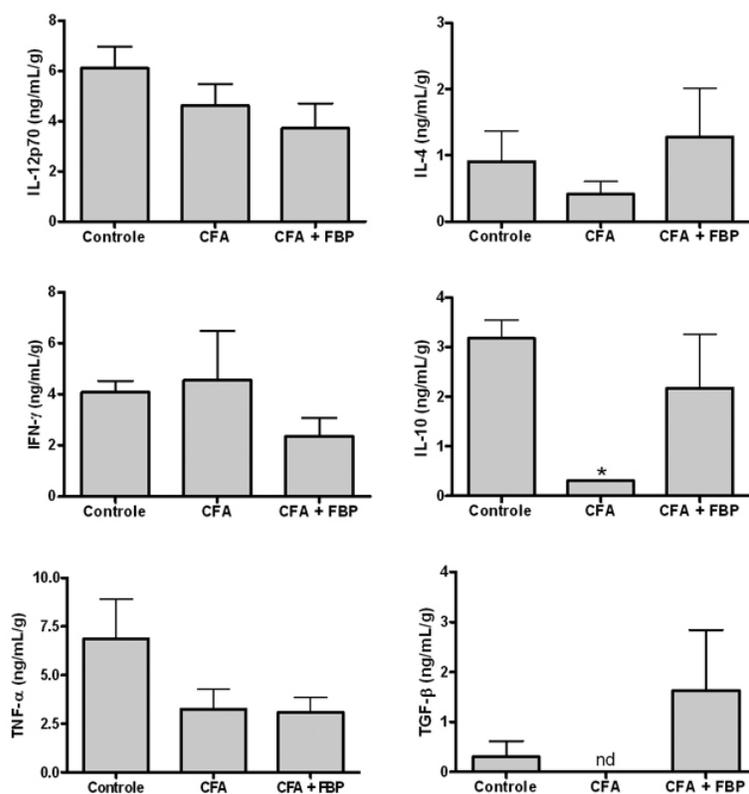


Figura 16. Detecção de citocinas no fígado de camundongos infectados por *P. brasiliensis*, 30 dias após o tratamento.

Camundongos foram infectados por via intravenosa com 1×10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Aos 21 dias de infecção foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA e CFA + FBP. Após 30 dias, os animais foram mortos, tendo seus fígados retirados, pesados e homogeneizados em PBS. Após a homogeneização, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante colhido para dosagem das citocinas pelo método de ELISA. As barras representam as médias \pm SEM das concentrações de citocinas de três animais em duplicata. * $p < 0,05$ em relação ao animal controle. nd – não detectável.

2.3. Análise do baço dos animais infectados por *P. brasiliensis*

Também determinamos a quantidade de fungos no baço dos animais infectados e tratados sob os três diferentes regimes (Figura 17), e novamente, o grupo controle e o grupo CFA + FBP não foram capazes de controlar a proliferação do fungo no órgão. Observamos

nestes dois grupos grande quantidade de fungos recuperados. Não foram detectadas fungos nos baços dos animais do grupo CFA.

Observando a análise histológica do baço dos diversos grupos (Figura 18), evidenciamos a presença de granulomas nos grupos controle e CFA + FBP, mas não no grupo CFA, condizente com os achados do fígado.

A produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α e TGF- β também foi avaliada (Figura 19), não sendo possível detectar diferenças significativas para a maior parte das citocinas, exceção feita ao maior quantidade de IL-10 nos animais tratados com CFA e de TGF- β nos animais tratados com CFA + FBP. Esses achados são difíceis de serem analisados, por se tratar da produção de citocinas no baço.

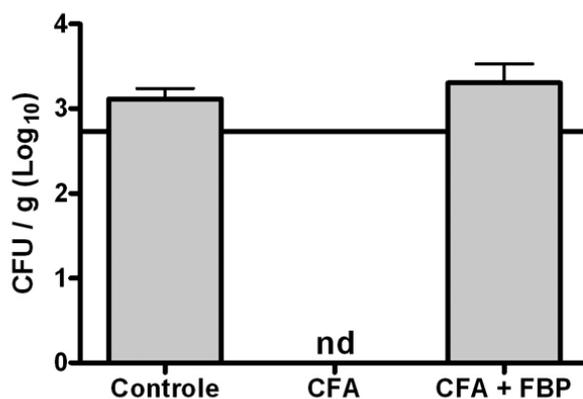


Figura 17. Quantificação de CFU no baço de animais infectados.

Camundongos foram infectados com 1×10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Aos 21 dias de infecção foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA e CFA + FBP. Após 30 dias do tratamento, os animais foram mortos e fragmentos do baço foram pesados, fracionados e o número de CFU analisado. A linha horizontal representa o número de CFU dos animais no dia do início do tratamento (21 dias de infecção). As barras representam as médias \pm SEM das CFU. nd – não detectável.

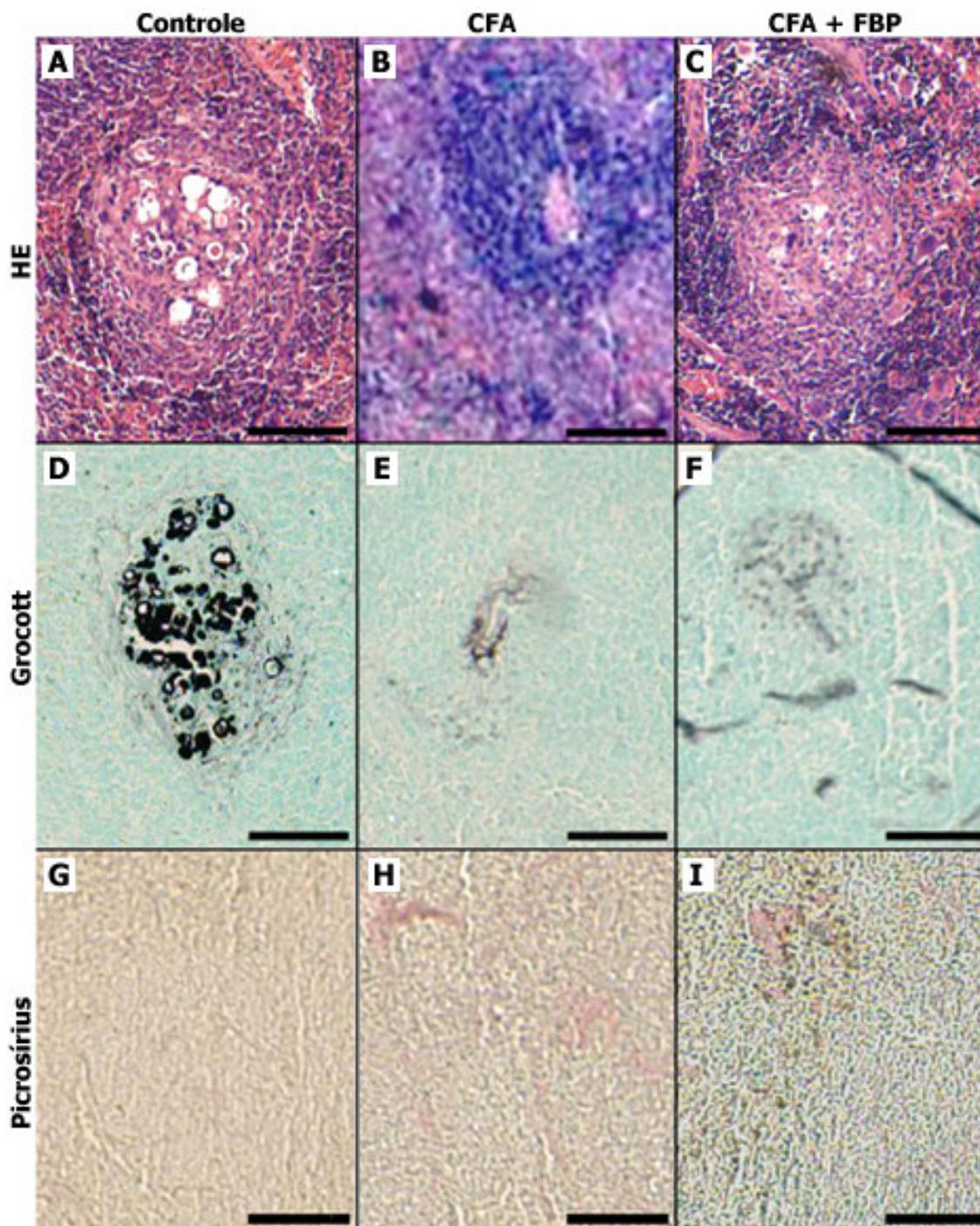


Figura 18. Análise histológica das secções de baço de camundongos infectados por *P. brasiliensis*, 30 dias após o tratamento.

Camundongos foram infectados por via intravenosa com 1×10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Aos 21 dias de infecção foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA e CFA + FBP. Após 30 dias, fragmentos do baço foram colhidos e processados para análise histológica. Observa-se a presença de granulomas com leveduras viáveis em seu interior nos animais tratados com IFA (A, D e G) e CFA + FBP (C, F e I). Ausência de granulomas nos tratados com CFA (B, E e H). Barras = 0,2 mm.

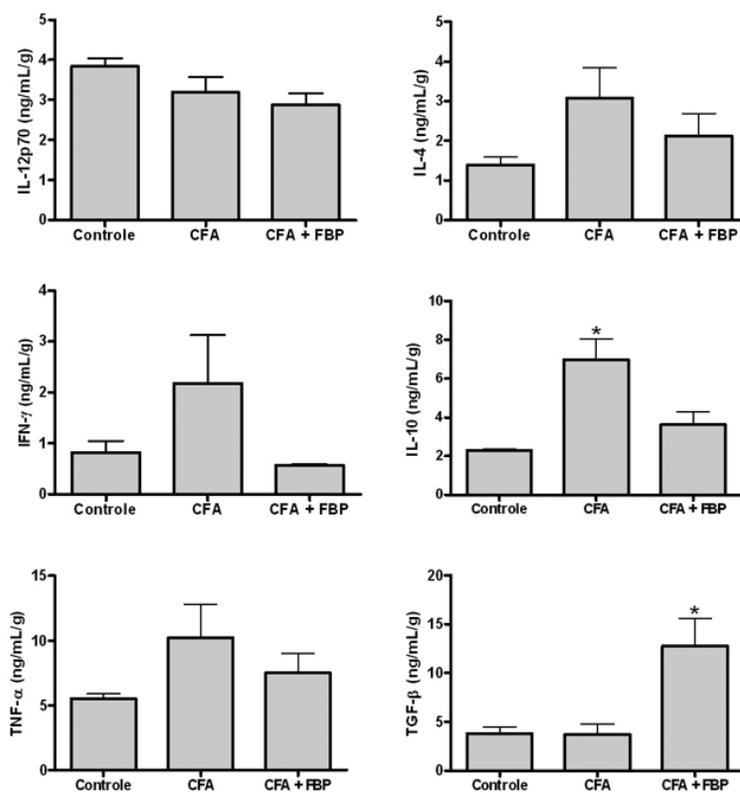


Figura 19. Detecção de citocinas no baço de camundongos infectados por *P. brasiliensis*, 30 dias após o tratamento.

Camundongos foram infectados por via intravenosa com 1×10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Aos 21 dias de infecção foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA e CFA + FBP. Após 30 dias, os animais foram mortos, tendo seus baços retirados, pesados e homogeneizados em PBS. Após a homogeneização, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante colhido para dosagem das citocinas pelo método de ELISA. As barras representam a médias \pm SEM das concentrações de citocinas de três animais em duplicata. * $p < 0,05$ em relação ao animal controle.

2.4. Sorologia dos animais infectados por *P. brasiliensis*

Os níveis de anticorpos específicos contra *P. brasiliensis* foram dosados no soro dos animais (Figura 20) e comparados com animais não infectados. Analisamos os subtipos das imunoglobulinas (IgG1 e IgG2a) para avaliar, indiretamente, o padrão de resposta de citocinas (Th1 ou Th2) desenvolvida por cada grupo. A razão IgG2a/IgG1 demonstra um perfil com

tendência ao padrão de resposta Th2 em todos os grupos. Um dado interessante obtido desses experimentos foi a quantidade pequena de IgA no grupo CFA, quando comparada aos dois outros grupos. Em termos de anticorpos IgM, não houve diferença estatística entre o três grupos. A dosagem de antígenos circulantes do fungo (Figura 21) mostrou que nos animais do grupo CFA, que pelos parâmetros anteriores estavam controlando a infecção, havia uma concentração alta de antígenos séricos, contrastando com a insignificante concentração de antígenos séricos dos outros grupos que apresentavam alta carga fúngica.

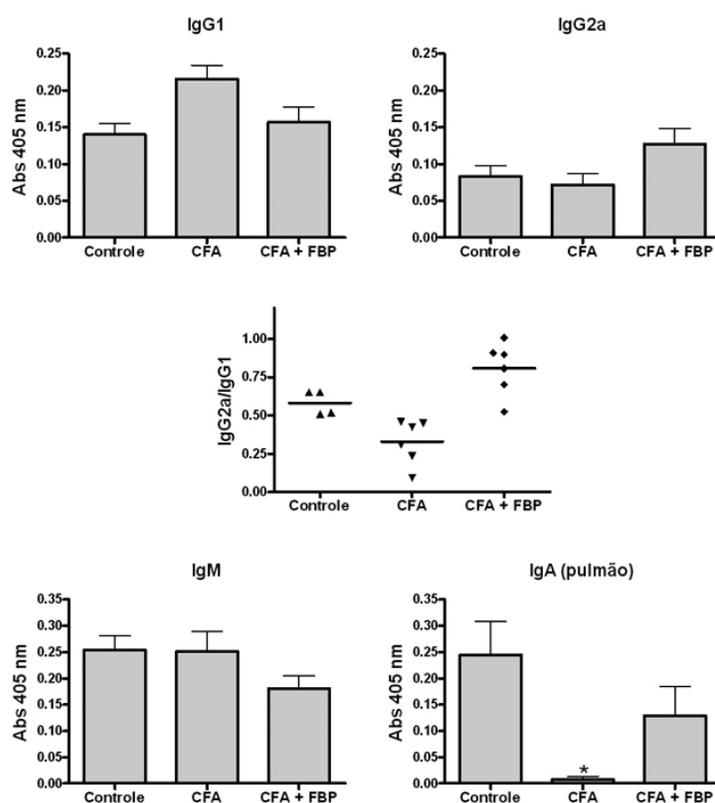


Figura 20. Detecção de IgG1, IgG2a, IgM e IgA específicas ao antígeno de *P. brasiliensis* em amostras de soro e sobrenadante de pulmão de animais infectados. Camundongos foram infectados por via intravenosa com 1×10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Aos 21 dias de infecção foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA e CFA + FBP. Após 30 dias, o soro destes animais foi colhido e dosado para imunoglobulinas específicas ao fungo. Soros de animais não infectados foram usados para obter um *cutoff* para a dosagem de imunoglobulinas. As barras representam as médias \pm SEM dos soros provenientes de três animais por grupo e representam 2 experimentos. * $p < 0,05$ em relação ao animal controle.

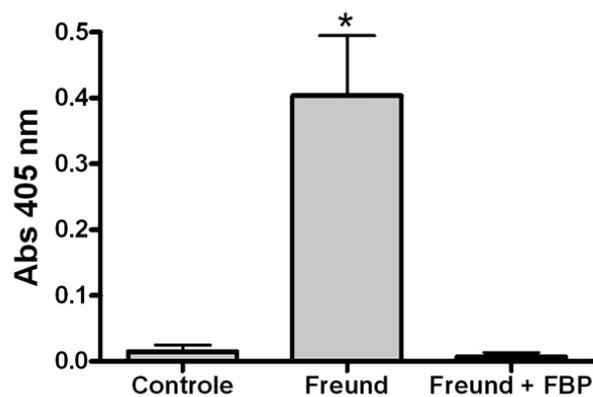


Figura 21. Detecção de antígeno circulante de *P. brasiliensis* em amostras de soro de animais infectados.

Camundongos foram infectados por via intravenosa com 1×10^6 leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Aos 21 dias de infecção foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA e CFA + FBP. Após 30 dias, o soro destes animais foi colhido e dosado para antígenos circulantes do fungo. Soros de animais não infectados foram usados como *background* para a dosagem. As barras representam as médias \pm SEM dos soros provenientes de três animais por grupo e representam 2 experimentos. * $p < 0,05$ em relação ao animal controle.

3. FBP induz padrão de resposta Th2 *in vitro*

De modo a explicar o efeito de FBP na PCM experimental, avaliamos a proliferação celular de células do sistema imunitário e produção de citocinas induzidas por FBP.

Primeiramente avaliamos a capacidade de FBP em induzir proliferação em cultura de células esplênicas (Figura 22). Células esplênicas foram cultivadas por até 96h em presença de concentrações crescentes de FBP ou apenas meio. Observamos a indução de proliferação por FBP de maneira tempo e dose dependente.

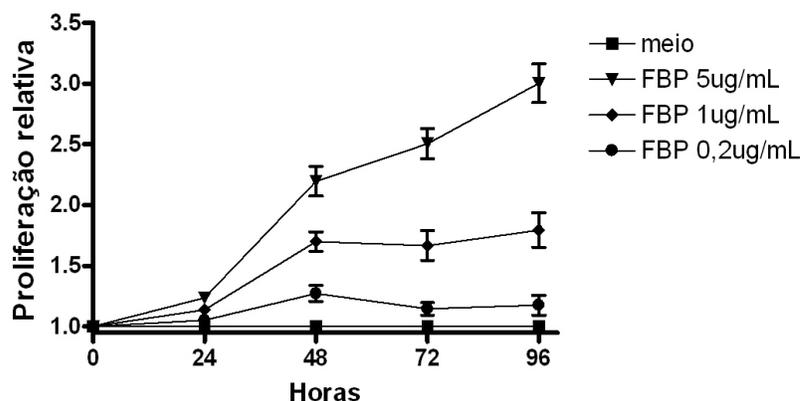


Figura 22. Resposta proliferativa a FBP em cultura de células esplênicas.

Células esplênicas (1×10^6) foram cultivadas com doses crescentes de FBP durante até 96h e a resposta proliferativa foi avaliada pela metodologia de redução de MTT. Cada ponto representa a média \pm SEM de três animais e é representativo de 3 experimentos independentes.

Em vista dos resultados de proliferação fomos investigar se FBP estava induzindo a produção de citocinas. Para tanto, células esplênicas foram cultivadas por 48h em presença de $5\mu\text{g/mL}$ de FBP, e os sobrenadantes dessas culturas foram ensaiados por ELISA para a detecção de IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α e TGF- β (Figura 23). Observamos que FBP induziu apenas a produção de IL-2, IL-4 e IL-10, sendo as demais citocinas não. Esse

perfil de citocinas é condizente com um perfil Th2, também associado com a indução de células reguladoras.

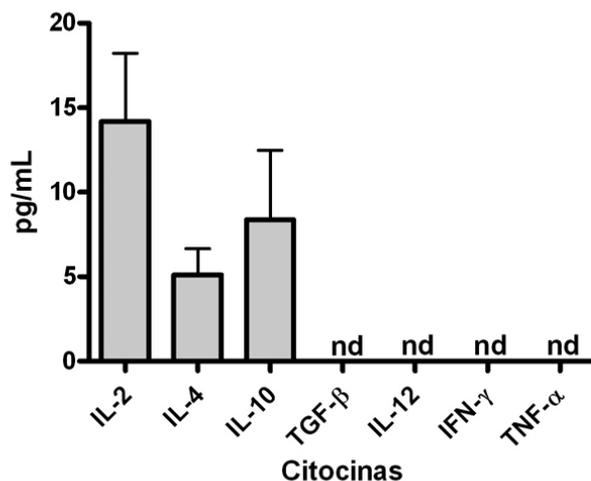


Figura 23. Produção de citocinas frente a estímulo com FBP em cultura de células esplênicas.

Células esplênicas (1×10^6) foram cultivadas com $5 \mu\text{g/mL}$ de FBP durante 48h e a produção de citocinas foi avaliada pelo método de ELISA. Cada ponto representa a média \pm SEM de três animais e é representativo de 2 experimentos independentes. nd – não detectável.

Essa nova hipótese nos impeliu a analisar que tipo celular estava proliferando frente a esse microambiente induzido por FBP, com presença de IL-2, IL-4 e IL-10. Realizamos então, novamente, o ensaio de proliferação de células esplênicas, só que desta vez as células foram marcadas com CFSE, e cultivadas por 48h em presença de $5 \mu\text{g/mL}$ de FBP, $2 \mu\text{g/mL}$ de ConA (controle positivo) ou apenas meio (controle negativo). Após as 48h as células esplênicas foram marcadas com anticorpos anti-CD4 PE, anti-CD8 PE ou anti-CD19 PE, para identificar a população de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B, respectivamente. Analisando os resultados obtidos no FACS (Figura 24), observamos que células T CD4⁺ não proliferam frente ao estímulo de FBP, se comportando de modo muito semelhante ao controle sem estímulo (meio – 2,4%) e, conseqüentemente, com proliferação bem menor do que o controle positivo (ConA

– 34,4%). Na população de células T CD8⁺ houve uma proliferação de $7,4 \pm 1,5\%$, que foi maior que a do meio (1,8%), porém bem inferior à observada para ConA (36,8%). As células B estimuladas com FBP proliferaram em índices similares aos das estimuladas com ConA, 30 e 31,5%, respectivamente, o que foi muito superior ao das estimuladas sem estímulo (meio), 2,4%.

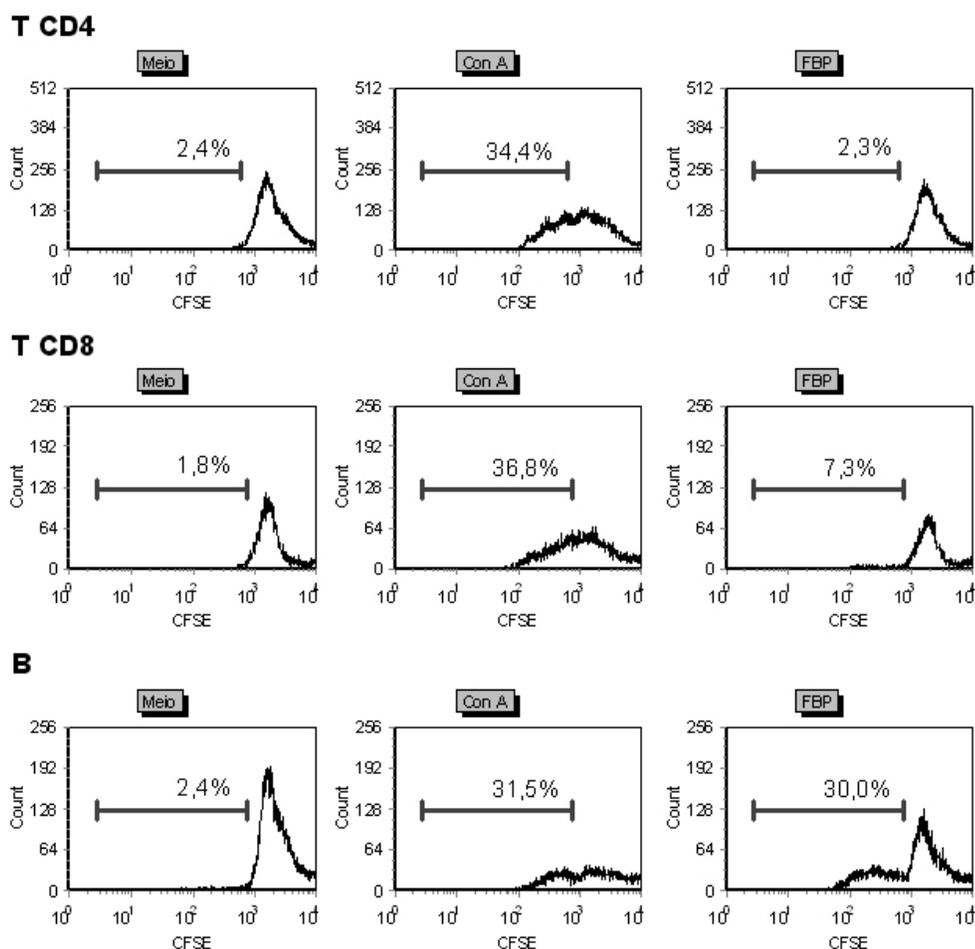


Figura 24. Resposta proliferativa a FBP em cultura de células esplênicas.

Células esplênicas (5×10^6) foram marcadas com CFSE e cultivadas por 48h em presença de meio, $2\mu\text{g/mL}$, ConA ou $5\mu\text{g/mL}$ de FBP. Após o estímulo, as células esplênicas foram marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD8 ou anti-CD19 de modo a identificar a população que prolifera diante do estímulo com FBP. Cada ponto representa a média \pm SEM de 3 animais em triplicata.

Esses resultados *in vitro* poderiam explicar parcialmente o que poderia estar ocorrendo na PCM experimental, uma vez que a indução de uma resposta Th2 por FBP poderia estar se contrapondo ao efeito Th1 induzido por CFA, e o aumento de células B poderia influenciar na apresentação de antígenos e na produção de anticorpos, estes seriam capazes de estimular a alta produção de TGF- β pelo pulmão. Restava saber se FBP realmente teria esses efeitos *in vivo*. Para tanto, retomamos os ensaios *in vivo* avaliando dessa vez os efeitos de CFA e FBP isoladamente.

4. Determinação dos fatores que induzem imunossupressão por FBP *in vivo*

Visando o melhor entendimento dos efeitos de CFA e FBP *in vivo*, realizamos uma série de experimentos. Dividimos animais em três grupos a saber: o grupo controle injetado por via subcutânea com uma dose única de salina emulsificada com adjuvante incompleto de Freund (controle - IFA), o grupo CFA administrado por via subcutânea com uma dose única de salina emulsificada com adjuvante completo de Freund (CFA) e o grupo FBP administrado por via subcutânea com uma dose única de 25 μ g de FBP emulsificada com IFA. Em uma primeira etapa fomos avaliar os efeitos de CFA e FBP sobre os animais do ponto de vista hematológico, para tanto acompanhamos o hemograma dos animais por um período de 21 dias. Como mostrado na Figura 25, observamos que os grupos CFA e FBP apresentaram um pico de linfocitose no sétimo dia, retornando homeostaticamente a seus níveis normais. Em relação à FBP, observamos que a linfocitose não era devido ao adjuvante, uma vez que IFA isoladamente (IFA em salina) não induziu linfocitose no sétimo dia.

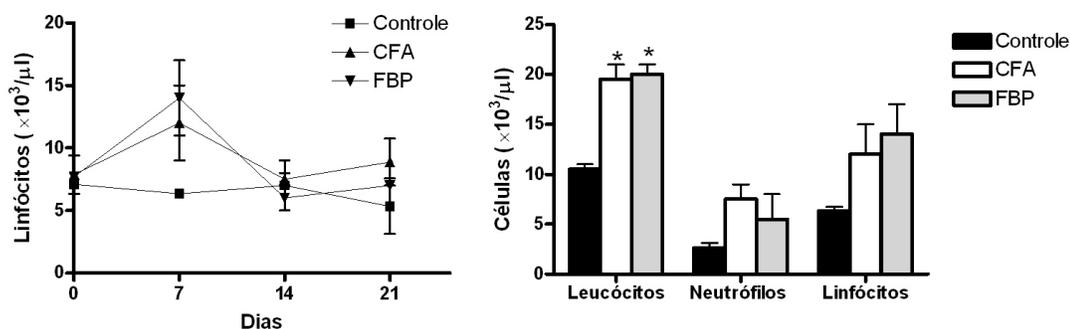


Figura 25. Resposta proliferativa de leucócitos circulantes frente a estímulo com CFA ou FBP.

Camundongos foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA e FBP (em IFA) por via subcutânea. Nos dias 0, 7, 14, e 21 o sangue destes animais foi colhido e realizado hemograma completo. Podemos observar uma discreta linfocitose aos sete dias de tratamento com CFA e FBP. * $p < 0,05$ em relação ao animal controle.

Escolhemos então o sétimo dia após a administração dos estímulos como tempo ideal para avaliação da população residente do baço desses animais. Primeiramente avaliamos a composição celular, quanto ao número de linfócitos totais, e suas subpopulações T CD4⁺, T CD8⁺ e B (Figura 26). Não houve diferença estatisticamente significativa entre essas células no baço nos três grupos de animais avaliados.

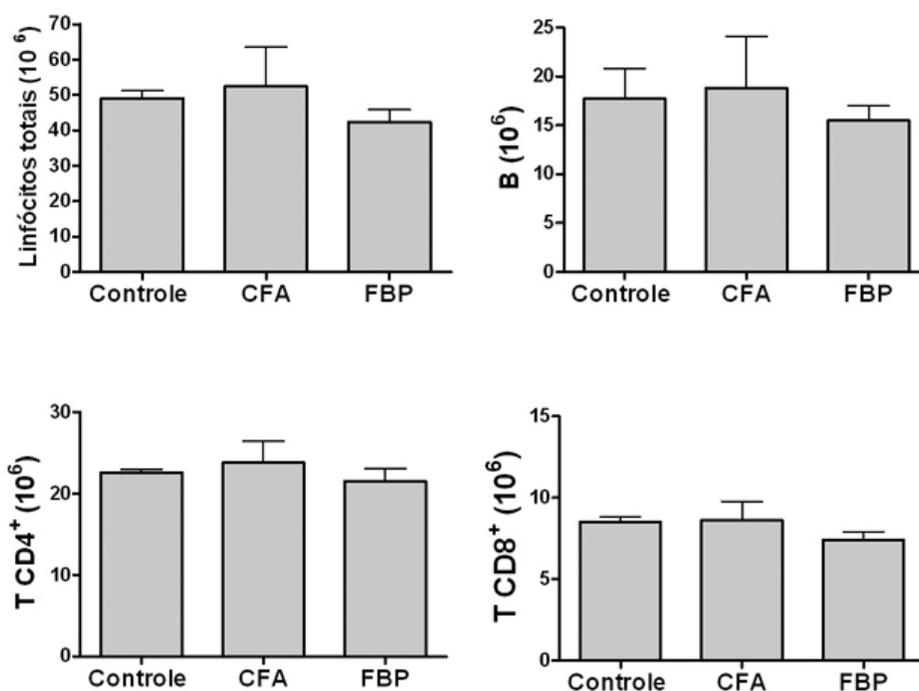


Figura 26. Quantificação de células no baço de animais estimulados com CFA ou FBP.

Camundongos foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA ou FBP (em IFA) por via subcutânea. Após sete dias, os animais foram mortos, tendo seus baços retirados. As células esplênicas foram marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD8 ou anti-CD19 de modo a identificar a população residente no baço. Cada barra representa a média \pm SEM de três animais em duplicata.

Essas populações foram devidamente marcadas e analisadas quanto a presença de moléculas co-estimulatórias (CD28) (Figura 27), marcadores de ativação (CD25) e regulação (Foxp3) (Figura 28). Não observamos alterações significativas entre as populações celulares

esplênicas dos animais dos três grupos. Quanto às células $CD8^+$, também avaliamos a presença dos marcadores $CD28$ (Figura 29), observando um aumento significativo de células $CD8^+CD28^+$ nos animais do grupo CFA, indicando uma população de células mais ativadas. Não foram observado aumento dessas células nos outros dois grupos. Quando analisadas as células $CD8^+$ quanto à presença de $CD25$ e $Foxp3^+$ (Figura 30), observamos um aumento significativo de células T $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ nos animais tratados com FBP e CFA em relação ao controle, indicando que FBP induz células T com perfil regulatório.

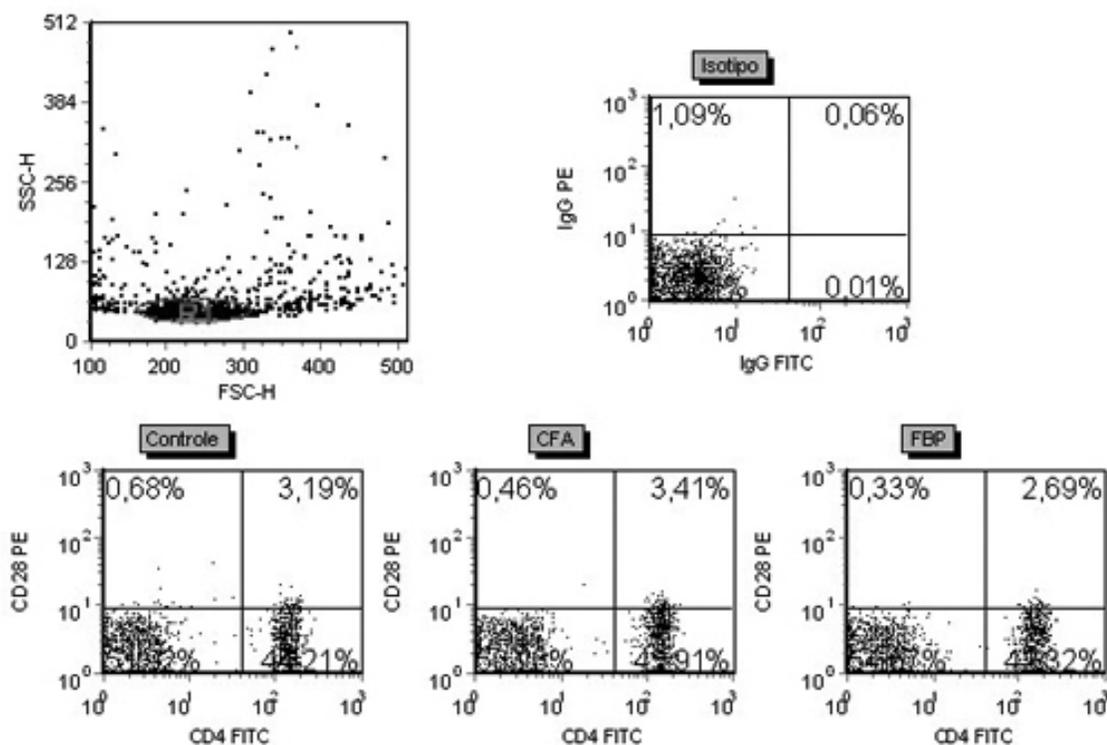


Figura 27. Expressão de $CD28^+$ em células T $CD4^+$ de animais estimulados com CFA ou FBP. Camundongos foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA ou FBP por via subcutânea. Após 7 dias, as células esplênicas destes animais foram marcadas com anticorpos anti- $CD4$ FITC e anti- $CD28$ PE e analisadas quanto a presença desses marcadores. Experimento realizado com 3 animais por grupo, dados representativos de um único animal.

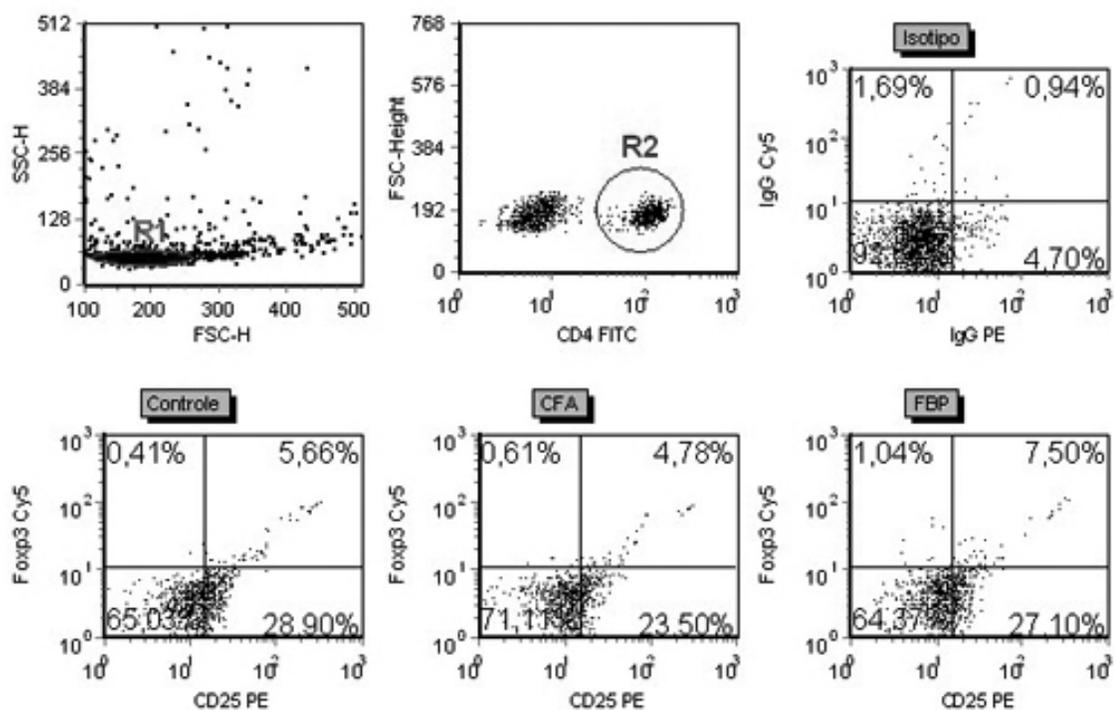


Figura 28. Expressão de Foxp3⁺ em células T CD4⁺CD25⁺ em animais estimulados com CFA ou FBP.

Camundongos foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA ou FBP (+ IFA) por via subcutânea. Após sete dias, as células esplênicas destes animais foram marcadas com anticorpos anti-CD4 FITC, anti-CD25 PE e anti-Foxp3 PE-Cy5 e analisadas quanto a presença desses marcadores. Experimento realizado com três animais por grupo, sendo os dados representativos de um único animal.

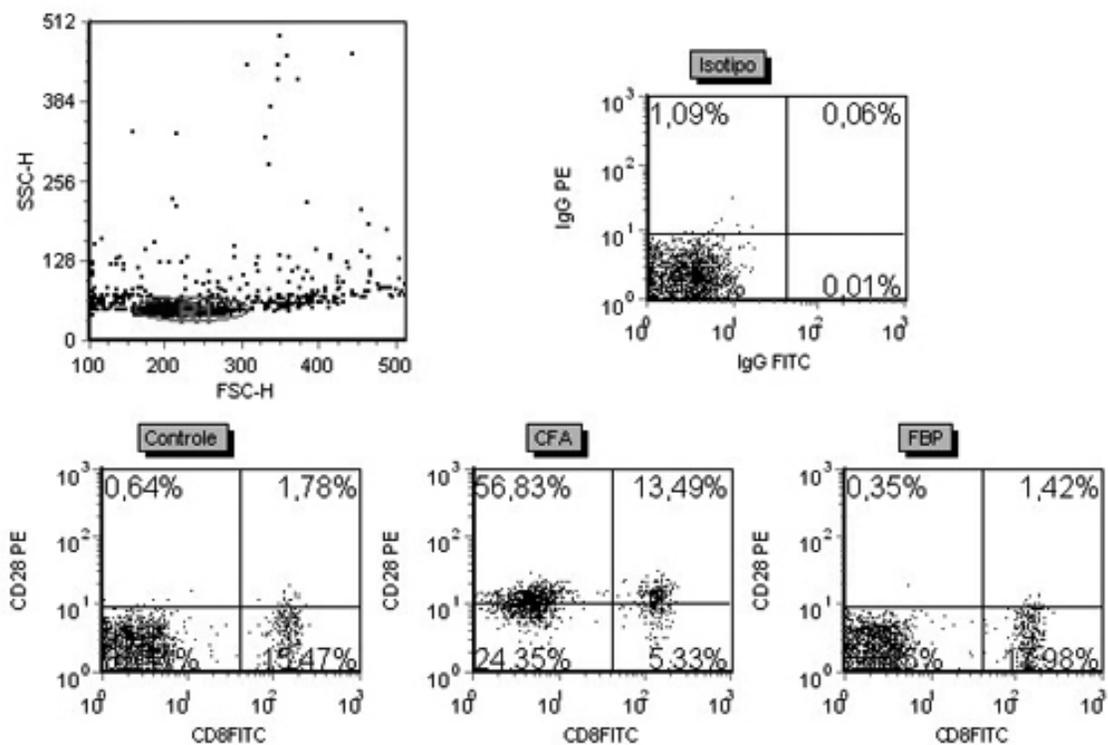


Figura 29. Expressão de CD28⁺ em células T CD8⁺ de animais estimulados com CFA ou FBP.

Camundongos foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA ou FBP (+ IFA) por via subcutânea. Após sete dias, as células esplênicas destes animais foram marcadas com anticorpos anti-CD8 FITC e anti-CD28 PE e analisadas quanto à presença desses marcadores. Experimento realizado com três animais por grupo, dados representativos de um único animal.

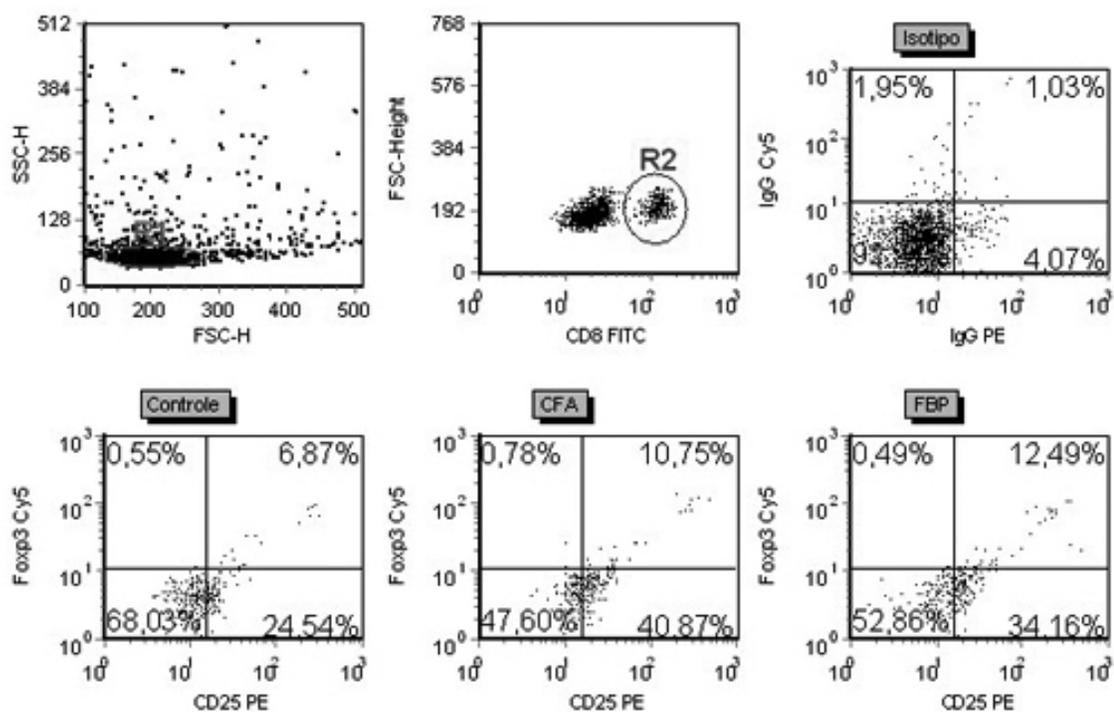


Figura 30. Expressão de Fopx3⁺ em células T CD8⁺CD25⁺ em animais estimulados com CFA ou FBP.

Camundongos foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA ou FBP (+ IFA) por via subcutânea. Após sete dias, as células esplênicas destes animais foram marcadas com anticorpos anti-CD8 FITC, anti-CD25 PE e anti-Fopx3 PE-Cy5 e analisadas quanto à presença desses marcadores. Experimento realizado com três animais por grupo, dados representativos de um único animal.

Os achados referentes à expressão de moléculas co-estimulatórias, marcadores de ativação e regulação em linfócitos T foram sumarizados (Figura 31) para facilitar a visualização e comparação entre os grupos. Em relação às células T $CD8^+CD25^+Foxp3^+$, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre o grupo FBP e o controle, nota-se uma clara tendência de aumento dessas células regulatórias nos animais imunizados com FBP.

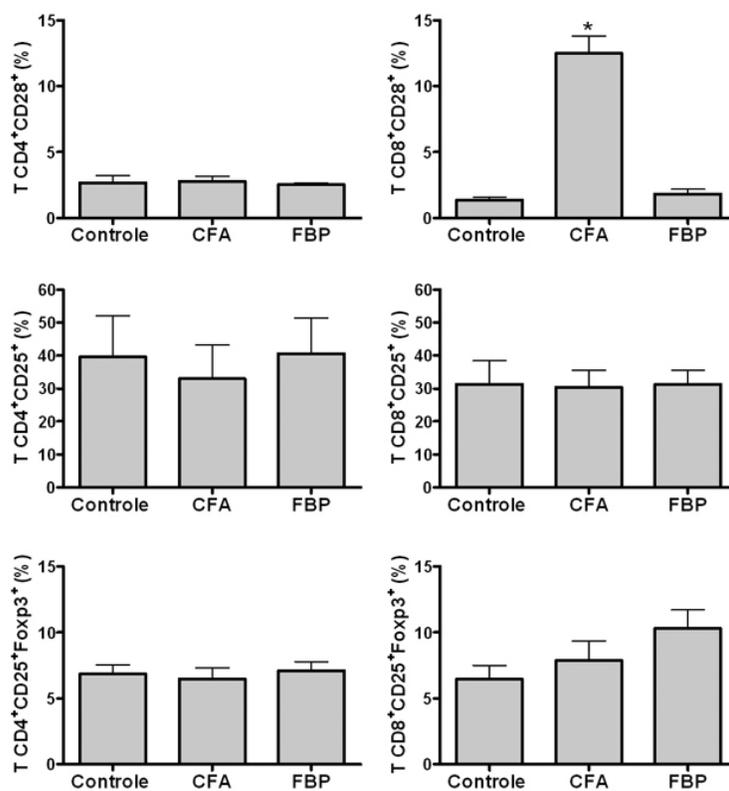


Figura 31. Expressão de moléculas co-estimulatórias, marcadores de ativação e regulação em linfócitos T de animais estimulados com CFA ou FBP.

Camundongos foram submetidos a tratamento com IFA (controle), CFA ou FBP (+ IFA) por via subcutânea. Após sete dias, as células esplênicas destes animais foram marcadas com anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8 FITC, anti-CD28 ou anti-CD25 PE e anti-Foxp3 PE-Cy5 e analisadas quanto a presença desses marcadores. Observa-se um aumento de moléculas co-estimulatórias em células T $CD8^+$ tratadas com CFA, e uma tendência de crescimento na população de células T $CD8^+$ de fenótipo regulador, quando tratadas com FBP. * $p < 0,05$ em relação ao animal controle.

DISCUSSÃO

Nesse estudo, demonstramos que *Paracoccidioides brasiliensis* apresenta um grupo de proteínas que tem por peculiaridade a afinidade com fetuína (FBP) e capacidade de reconhecer elementos da matriz celular pulmonar. A fim de se usar FBP como terapia para PCM, tratamos animais infectados cronicamente com a cepa 18 de *P. brasiliensis* com FBP ou salina emulsificada em CFA, um potente indutor de resposta Th1. A simples administração de um imunoestimulador de padrão Th1 (CFA) foi eficaz em restaurar a capacidade de resposta do hospedeiro, abolindo o estado de anergia que se encontrava, sendo assim capaz de controlar a disseminação e proliferação do fungo, levando a quadro de redução da carga fúngica de mais de 99% no pulmão, fígado e baço desses animais. Por outro lado, o tratamento dos animais infectados com FBP + CFA, não resultou em melhora no quadro dos animais. Estes apesar de apresentarem granulomas compactos e bem estruturados, não eram capazes de eliminar o fungo, ou seja, FBP reverteu o benefício evidente do tratamento com CFA, tantos em termos de patologia quanto aos parâmetros de resposta imunológica.

A intenção de se estudar proteínas ligantes de fetuína de *P. brasiliensis* foi motivada inicialmente pelo fato dessas moléculas apresentarem *N*- e *O*-glicosilação e alto conteúdo de ácido siálico (BAENZIGER e FIETE, 1979; NILSSON *et al.*, 1979; EDGE e SPIRO, 1987; GREENE *et al.*, 1988), o que poderia de alguma forma se correlacionar com a glicosilação de proteínas de matriz extracelular, como a laminina (KNIBBS *et al.*, 1989). Os elementos de matriz são conhecidos por serem elementos importantes no reconhecimento, adesão e invasão de diversos patógenos (VIMR e LICHTENSTEIGER, 2002; VONLAUFEN *et al.*, 2007). Embora tenhamos conseguido isolar proteínas de *P. brasiliensis* por afinidade à fetuína, essas não aglutinavam eritrócitos, não eram desadsorvidas da coluna de fetuína com nenhum dos diversos açúcares testados, nem tinham atividade enzimática. No entanto, apresentaram

interação com proteínas de matriz extracelular do pulmão, o que sugere que a interação era do tipo proteína-proteína. Além disso, sabemos que esses tipos de interações proteína-proteína, como a da integrina que liga matriz extracelular, podem ser dependente de cátions divalentes, como o Ca^{2+} (ALTIERI, 1991). O fato da ligação de FBP ser inibida por EDTA (quelantes de cátions divalentes), mas não por EGTA (quelantes de Ca^{2+}), indicou-nos que FBP dependem de cátions divalentes para interação, apesar de Ca^{2+} não ser essencial para a ligação. Não foi possível identificar qual era esse íon, uma vez que a suplementação com sais para restabelecer a atividade das proteínas levava a precipitação destas. Esse padrão de agregação sugere que as proteínas de FBP possam ser altamente hidrofóbicas, desde que proteínas deste tipo tendem a precipitar frente à adição de íons que modificam as tensões (molaridade) da solução (LIENQUEO *et al.*, 2006).

A PCM é doença crônica e as interações entre o fungo e o hospedeiro determinam eventos imunopatológicos que são importantes para o controle da disseminação fúngica. A doença é caracterizada pela presença de lesões granulomatosas e a persistência do fungo no tecido do hospedeiro em focos quiescentes (BRUMMER *et al.*, 1993). Os granulomas maduros são compostos por macrófagos, células epitelióides e células gigantes circundados por linfócitos T CD4^+ e CD8^+ e linfócitos B (BRUMMER *et al.*, 1993; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002). A persistência dos fungos e manutenção da inflamação crônica são característicos. Podemos estabelecer uma correlação entre a imunidade celular, as alterações histopatológicas e a gravidade da doença (PERACOLI *et al.*, 1982). Embora exista heterogeneidade de apresentação da PCM, formas mais ou menos graves, ela é sempre correlacionada com a intensidade da depressão da resposta imune do hospedeiro (MOTA *et al.*, 1985). Tendo como base a ligação de FBP à matriz extracelular de pulmão, tornou-se razoável supor que essa proteína poderia interagir *in vivo* com proteínas dessa matriz e ser importante para instalação do fungo. Isso nos levou a hipótese de que a indução de uma

resposta imunitária do tipo Th1, que é protetora na PCM (CLEMONS *et al.*, 2000), dirigida contra essa proteína pudesse ser usada para tratar animais com PCM. Se por um lado, uma única injeção de CFA eliminou os fungos dos animais infectados, deixando os pulmões morfo e histologicamente similares a camundongos sem infecção, de maneira inesperada, observamos que FBP emulsificada em CFA revertia o efeito benéfico de CFA nos animais. Em um dos únicos trabalhos em que CFA foi administrado após a infecção, para aumentar a resposta a um peptídeo de gp43 (p10) num processo de imunização combinado com terapia com drogas, MARQUES *e cols.*(2006) mostram que esse peptídeo tem efeito benéfico na redução de fungos, podendo diminuir o tempo de terapia com drogas do grupo tratado. Entretanto, quando esses autores injetaram CFA sozinho mostraram que o número de CFU no pulmão desses animais era alto e similar ao dos animais não imunizados, dados esses discordantes dos achados de nosso trabalho. Tal diferença de resultados pode ser devida ao processo de imunização, que nosso caso foi uma única dose de CFA 20 dias após a infecção, enquanto que Marques *et al.* administraram uma dose inicial de CFA e três de IFA semanalmente.

Para avaliar o quadro clínico desses animais, fizemos a análise histopatológica dos pulmões, fígado e baço dos animais dos três grupos. Nos animais do grupo injetado com CFA + FBP, apesar de serem observados granulomas compactos e bem estruturados, esses não eram capazes de eliminar o fungo. Esses animais apresentavam uma dicotomia, tinham uma lesão pulmonar menor, com pequeno infiltrado inflamatório se comparados ao controle, mas continham uma quantidade maior de fungos em seus granulomas. Esse quadro foi diferente dos outros dois grupos, uma vez que os animais tratados com CFA resolveram a infecção e tinham órgãos sem lesão aparente, enquanto os animais controles, além de terem grande quantidade de CFU, apresentavam grande comprometimento do parênquima pulmonar. Nos

animais tratados com FBP, a resposta imune parecia estar sendo eficiente em conter os fungos e isolá-los do hospedeiro, porém não conseguia destruí-lo.

O fato de não encontramos relatos similares na literatura do quadro aqui relatado, nos levou a investigar o porque desse fenômeno e o papel da FBP nessa aparente supressão dos animais tratados com CFA + FBP. Observamos que FBP possuía a capacidade de induzir a proliferação de linfócitos B, com a produção de citocinas IL-2, IL-4 e IL-10, características de um padrão Th2 (MOSMANN e COFFMAN, 1989; MOSMANN, 2000). Em um primeiro momento isso não nos chamou a atenção por parecer normal e até um pouco óbvio. Com base nesses resultados, aventamos a hipótese de que FBP estaria favorecendo a apresentação preferencialmente por células B, o que estimularia a produção de um padrão de resposta Th2 por linfócitos T CD4⁺, se contrapondo ao efeito de CFA.

O padrão de resposta Th2 não é condizente com os achados histológicos que obtivemos nos animais tratados com FBP, pois apesar do expressivo número de fungos nos pulmões, fígado e baço desses animais, o comprometimento desses órgãos foi muito menor do que no controle. Passamos a investigar o papel tanto de CFA quanto de FBP sobre os animais, separando o efeito de cada um deles. Os resultados obtidos de animais não infectados tratados com CFA demonstraram que há um aumento na população de linfócitos T CD8⁺ ativados, fato esse que explicaria a eliminação tão eficiente dos fungos nos animais tratados com CFA, uma vez que os linfócitos T CD8⁺ são importantes na eliminação de fungos em infecções, como por exemplo em candidíase (GHALEB *et al.*, 2003), criptococose (LINDELL *et al.*, 2005). Mais recentemente foi demonstrado por (PEREIRA, 2006)Pereira (2006) que animais que destituídos de linfócitos T CD8⁺, quando infectados com a cepa 18 de *P. brasiliensis* eram incapazes de eliminar o fungo. Além disso, CFA é um reconhecido como um potente indutor de resposta Th1, por ativar as células através da estimulação de diversos receptores, como os do tipo Toll 2, 4, 7 e 9, dentre outros. Já os resultados obtidos com animais tratados com FBP,

demonstraram um aumento na população de linfócitos T CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ (T CD8⁺reg). Essa população é caracterizada por suprimir a resposta citotóxica de linfócitos T CD8⁺ ativados, e é induzida por IL-2 e IL-15 (AHMADZADEH *et al.*, 2007) e por linfócitos B reguladores (Breg) (MIZOGUCHI e BHAN, 2006). Os linfócitos Breg poderiam também estar envolvidos, desde que se desenvolvem em ambientes pró-inflamatórios, são produtores de IL-10 e têm a capacidade tanto de inibir a resposta inflamatória quanto de induzir tolerância. A IL-10 produzida pelas células Breg é capaz de suprimir a resposta imunitária por regular o balanço Th1/Th2, há relatos de que a presença desses linfócitos Breg é capaz de reverter o quadro da encefalomielite auto-imune experimental (FILLATREAU *et al.*, 2002). A associação entre o quadro histopatológico encontrado nos animais tratados com FBP e a diminuição de células CD8⁺ são corroborados pelo trabalho de Pereira (2006), que ao infectar animais deficientes de CD8⁺ encontrou granulomas bem formados, porém repletos de fungos.

A partir desses resultados estabelecemos a hipótese de que FBP é capaz de induzir uma população de linfócitos T CD8⁺reg, talvez através de linfócitos B, que em um ambiente pró-inflamatório, como o gerado por CFA, podem se diferenciar em linfócitos Breg. Essas células poderiam ser responsáveis por inibir a população de células ativadas por CFA, caracterizando toda a resposta observada nos animais tratados com CFA + FBP. Essa rede de inter-relação celular poderia estar influenciando na PCM. Essa hipótese é condizente e se correlaciona com achados histopatológicos e de citocinas nos órgãos. Os macrófagos de animais susceptíveis secretam altos níveis de TGF- β e baixos níveis de TNF- α , verificando-se ainda, produções baixas de IFN- γ e altas de IL-5 e IL-10. Já nos camundongos resistentes, constatou-se perfil oposto de secreção de citocinas acompanhado das produções precoce de IFN- γ e IL-2, e tardia de IL-4 e IL-5 (CANO *et al.*, 1998; SOUTO *et al.*, 2000; CALVI *et al.*, 2003a). Nos animais tratados com FBP, os altos níveis de TGF- β e a presença de linfócitos T

CD4⁺ seriam capazes de conter o fungo em granulomas bem estruturados, a supressão da atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ seria responsável pela alta quantidade de fungos viáveis no interior dos granulomas e a manutenção do estado de anergia poderia ser dada pelos linfócitos T CD8⁺reg, bem como Breg, através da produção de IL-10.

Esses eventos encontram embasamento na literatura, que relata que na tuberculose a ausência de linfócitos B causa doença menos grave, e impede a disseminação do *Mycobacterium tuberculosis*, e o aumento de células B causa forma mais grave da doença (BOSIO *et al.*, 2000). Na PCM, altos níveis de anticorpos circulantes estão relacionados com uma maior gravidade da doença (BIAGIONI *et al.*, 1984), e camundongos deficientes de linfócitos T CD8⁺ são incapazes de matar o fungo (PEREIRA, 2006)

Tomando como base o conjunto de informações encontrado neste trabalho, aventamos a hipótese que a administração de CFA + FBP estaria induzindo o aparecimento de linfócitos T CD8⁺reg, possivelmente através de células Breg, já que essas células aparecem em condições inflamatórias, e produzem altos níveis de IL-10, alterando o balanço Th1/Th2. Além disso, células B poderiam estar agindo como células apresentadoras de antígeno, desfavorecendo à indução de um padrão Th1 induzido por CFA. A população de linfócitos T CD8⁺reg seria responsável por suprimir a ação de linfócitos T CD8⁺ ativados, o que permitiria a persistência de fungos viáveis no interior dos granulomas. A alta produção de anticorpos pelas células B também estimularia o epitélio pulmonar a secretar grandes quantidades de TGF-β, o que aumentaria a supressão no órgão.

As proteínas de *P. brasiliensis* descritas nesse estudo se comportam como indutores de imunossupressão, comprometendo a imunidade protetora contra o fungo. O conjunto de resultados apresentados indica que FBP possa desempenhar papel importante no processo infeccioso por *P. brasiliensis*, e abre perspectivas de que uma intervenção nesse processo supressivo leve a um efeito benéfico na gravidade da PCM.

CONCLUSÕES

- FBP foi caracterizada como uma proteína desprovida de atividade enzimática e lectínica, tendo sua associação à fetuína dependente de cátions divalentes.
- FBP foi capaz de se ligar à matriz extracelular de pulmão de camundongo, sugerindo ser importante no processo infeccioso.
- FBP desempenha um papel importante na imunossupressão característica da PCM
- CFA, um forte indutor de resposta Th1, foi eficaz em aumentar a proteção dos animais infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*, melhorando o curso da PCM experimental.

O conjunto de resultados apresentados abre perspectivas para elaboração de novos modelos de intervenção na PCM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K. e Lichtman, A. H. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Elsevier. 2005. 562 p.
- Ahmadzadeh, M., Antony, P. A. e Rosenberg, S. A. IL-2 and IL-15 each mediate de novo induction of FOXP3 expression in human tumor antigen-specific CD8 T cells. J Immunother, v.30, n.3, Apr, p.294-302. 2007.
- Almeida, S. R. e Lopes, J. D. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. Braz J Med Biol Res, v.34, n.4, Apr, p.529-37. 2001.
- Almeida, S. R., Unterkircher, C. S. e Camargo, Z. P. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. Med Mycol, v.36, n.6, Dec, p.405-11. 1998.
- Altieri, D. C. Occupancy of CD11b/CD18 (Mac-1) divalent ion binding site(s) induces leukocyte adhesion. J Immunol, v.147, n.6, Sep 15, p.1891-8. 1991.
- Andrade, R. V., Da Silva, S. P., Torres, F. A., Pocas-Fonseca, M. J., Silva-Pereira, I., Maranhao, A. Q., Campos, E. G., Moraes, L. M., Jesuino, R. S., Pereira, M., Soares, C. M., Walter, M. E., Carvalho, M. J., Almeida, N. F., Brigido, M. M. e Felipe, M. S. Overview and perspectives the transcriptome of *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev Iberoam Micol, v.22, n.4, Dec, p.203-12. 2005.
- Andre, D. C., Lopes, J. D., Franco, M. F., Vaz, C. A. e Calich, V. L. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. Microbes Infect, v.6, n.6, May, p.549-58. 2004.
- Andrieu, S., Biguet, J., Dujardin, L. e Vaucelle, T. [Antigenic study of agents causing deep fungal infections by comparative analysis of culture media. I. *Histoplasma capsulatum* and *H. duboisii*. Relationship with *H. farciminosum*, *Gymnoascus demonbreunii*, *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*]. Mycopathol Mycol Appl, v.39, n.2, Nov 28, p.97-108. 1969.
- Baenziger, J. U. e Fiete, D. Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. J Biol Chem, v.254, n.3, Feb 10, p.789-95. 1979.
- Baida, H., Biselli, P. J., Juvenale, M., Del Negro, G. M., Mendes-Giannini, M. J., Duarte, A. J. e Benard, G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. Microbes Infect, v.1, n.4, Apr, p.273-8. 1999.
- Barbosa, M. S., Bao, S. N., Andreotti, P. F., De Faria, F. P., Felipe, M. S., Dos Santos Feitosa, L., Mendes-Giannini, M. J. e Soares, C. M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. Infect Immun, v.74, n.1, Jan, p.382-9. 2006.

Benard, G., Mendes-Giannini, M. J., Juvenale, M., Miranda, E. T. e Duarte, A. J. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. J Infect Dis, v.175, n.5, May, p.1263-7. 1997.

Benard, G., Romano, C. C., Cacere, C. R., Juvenale, M., Mendes-Giannini, M. J. e Duarte, A. J. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. Cytokine, v.13, n.4, Feb 21, p.248-52. 2001.

Biagioni, L., Souza, M. J., Chamma, L. G., Mendes, R. P., Marques, S. A., Mota, N. G. e Franco, M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.78, n.5, p.617-21. 1984.

Bisio, L. C., Silva, S. P., Pereira, I. S., Xavier, M. A., Venancio, E. J., Puccia, R., Soares, C. M. e Felipe, M. S. A new *Paracoccidioides brasiliensis* 70-kDa heat shock protein reacts with sera from paracoccidioidomycosis patients. Med Mycol, v.43, n.6, Sep, p.495-503. 2005.

Blotta, M. H., Mamoni, R. L., Oliveira, S. J., Nouer, S. A., Papaiordanou, P. M., Goveia, A. e Camargo, Z. P. 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, n.3, Sep, p.390-4. 1999.

Bocca, A. L., Hayashi, E. E., Pinheiro, A. G., Furlanetto, A. B., Campanelli, A. P., Cunha, F. Q. e Figueiredo, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. J Immunol, v.161, n.6, Sep 15, p.3056-63. 1998.

Borges-Walmsley, M. I., Chen, D., Shu, X. e Walmsley, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Trends Microbiol, v.10, n.2, Feb, p.80-7. 2002.

Bosio, C. M., Gardner, D. e Elkins, K. L. Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. J Immunol, v.164, n.12, Jun 15, p.6417-25. 2000.

Brummer, E., Castaneda, E. e Restrepo, A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol Rev, v.6, n.2, Apr, p.89-117. 1993.

Brummer, E., Hanson, L. H., Restrepo, A. e Stevens, D. A. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. J Immunol, v.140, n.8, Apr 15, p.2786-9. 1988.

_____. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. Infect Immun, v.57, n.8, Aug, p.2289-94. 1989.

Cacere, C. R., Romano, C. C., Mendes Giannini, M. J., Duarte, A. J. e Benard, G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. Clin Immunol, v.105, n.2, Nov, p.215-22. 2002.

Calich, V. L. e Kashino, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Braz J Med Biol Res, v.31, n.5, May, p.615-23. 1998.

Calich, V. L., Kipnis, T. L., Mariano, M., Neto, C. F. e Dias Da Silva, W. D. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. Clin Immunol Immunopathol, v.12, n.1, Jan, p.21-30. 1979.

Calvi, S. A., Peracoli, M. T., Mendes, R. P., Marcondes-Machado, J., Fecchio, D., Marques, S. A. e Soares, A. M. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. Microbes Infect, v.5, n.2, Feb, p.107-13. 2003a.

Calvi, S. A., Soares, A. M., Peracoli, M. T., Franco, M., Ruiz, R. L., Jr., Marcondes-Machado, J., Fecchio, D., Mattos, M. C. e Mendes, R. P. 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, n.15, Dec, p.1373-9. 2003b.

Campanelli, A. P., Martins, G. A., Souto, J. T., Pereira, M. S., Livonesi, M. C., Martinez, R. e Silva, J. S. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. J Infect Dis, v.187, n.9, May 1, p.1496-505. 2003.

Canas, B., Lopez-Ferrer, D., Ramos-Fernandez, A., Camafeita, E. e Calvo, E. Mass spectrometry technologies for proteomics. Brief Funct Genomic Proteomic, v.4, n.4, Feb, p.295-320. 2006.

Cano, L. E., Kashino, S. S., Arruda, C., Andre, D., Xidieh, C. F., Singer-Vermes, L. M., Vaz, C. A., Burger, E. e Calich, V. L. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. Infect Immun, v.66, n.2, Feb, p.800-6. 1998.

Castaneda, O. J., Alarcon, G. S., Garcia, M. T. e Lumbreras, H. *Paracoccidioides brasiliensis* arthritis. Report of a case and review of the literature. J Rheumatol, v.12, n.2, Apr, p.356-8. 1985.

Clemons, K. V., Calich, V. L., Burger, E., Filler, S. G., Graziutti, M., Murphy, J., Roilides, E., Campa, A., Dias, M. R., Edwards, J. E., Jr., Fu, Y., Fernandes-Bordignon, G., Ibrahim, A., Katsifa, H., Laignere, C. G., Meloni-Bruneri, L. H., Rex, J., Savary, C. A. e Xidieh, C. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. Med Mycol, v.38 Suppl 1, p.99-111. 2000.

Coelho-Castelo, A. A., Panunto-Castelo, A., Moreno, A. N., Dias-Baruffi, M., Jamur, M. C., Oliver, C., Roque-Barreira, M. C. e Rodrigues, V. Sm60, a mannose-binding protein from *Schistosoma mansoni* with inflammatory property. Int J Parasitol, v.32, n.14, Dec 19, p.1747-54. 2002.

Coltri, K. C., Casabona-Fortunato, A. S., Gennari-Cardoso, M. L., Pinzan, C. F., Ruas, L. P., Mariano, V. S., Martinez, R., Rosa, J. C., Panunto-Castelo, A. e Roque-Barreira, M. C. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and

- induces TNF-alpha production by macrophages. Microbes Infect, v.8, n.3, Mar, p.704-13. 2006.
- Coutinho, Z. F., Silva, D., Lazera, M., Petri, V., Oliveira, R. M., Sabroza, P. C. e Wanke, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). Cad Saude Publica, v.18, n.5, Sep-Oct, p.1441-54. 2002.
- Da Costa, J. C., Pagnano, P. M., Bechelli, L. M., Fiorillo, A. M. e De Lima Filho, E. C. Lymphocyte transformation test in patients with paracoccidioidomycosis. Mycopathologia, v.84, n.1, Dec 1, p.55-63. 1983.
- De Brito, T. e Franco, M. F. Granulomatous inflammation. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.36, n.2, Mar-Apr, p.185-92. 1994.
- Del Negro, G. M., Garcia, N. M., Rodrigues, E. G., Cano, M. I., De Aguiar, M. S., Lirio Vde, S. e Lacaz Cda, S. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.33, n.4, Jul-Aug, p.277-80. 1991.
- Diez, S., Gomez, B. L., Restrepo, A., Hay, R. J. e Hamilton, A. J. Paracoccidioides brasiliensis 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. J Clin Microbiol, v.40, n.2, Feb, p.359-65. 2002.
- Diniz, S. N., Cisalpino, P. S., Freire, A. T., Silva-Teixeira, D. N., Contigli, C., Rodrigues Junior, V. e Goes, A. M. In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of Paracoccidioides brasiliensis. Hum Immunol, v.62, n.8, Aug, p.799-808. 2001.
- Diniz, S. N., Cisalpino, P. S., Koury, M. C., Andrade, G. M., Nogueira, M. G. e Goes, A. M. In vitro human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated Paracoccidioides brasiliensis soluble antigens. Microbes Infect, v.1, n.5, Apr, p.353-60. 1999.
- Edge, A. S. e Spiro, R. G. Presence of an O-glycosidically linked hexasaccharide in fetuin. J Biol Chem, v.262, n.33, Nov 25, p.16135-41. 1987.
- Ferreira, K. S. e Almeida, S. R. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary Paracoccidioidomycosis. Immunol Lett, v.103, n.2, Mar 15, p.121-6. 2006.
- Ferreira, K. S., Lopes, J. D. e Almeida, S. R. Down-regulation of dendritic cell activation induced by Paracoccidioides brasiliensis. Immunol Lett, v.94, n.1-2, Jun 15, p.107-14. 2004.
- Fillatreau, S., Sweeney, C. H., Mcgeachy, M. J., Gray, D. e Anderton, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nat Immunol, v.3, n.10, Oct, p.944-50. 2002.
- Florez, A. M., Oviedo, A., Cardona, A., Herrera, M., Garcia, E., Restrepo, A. e Mcewen, J. G. Molecular cloning and characterization of two hsp 70 homologous genes from the dimorphic fungus Paracoccidioides brasiliensis. Biomedica, v.23, n.4, Dec, p.424-36. 2003.

- Fornazim, M. C., Balthazar, A., Quagliato, R., Jr., Mamoni, R. L., Garcia, C. e Blotta, M. H. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. Eur Respir J, v.22, n.6, Dec, p.895-9. 2003.
- Franco, M., Montenegro, M. R., Mendes, R. P., Marques, S. A., Dillon, N. L. e Mota, N. G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. Rev Soc Bras Med Trop, v.20, n.2, Apr-Jun, p.129-32. 1987.
- Ghaleb, M., Hamad, M. e Abu-Elteen, K. H. Vaginal T lymphocyte population kinetics during experimental vaginal candidosis: evidence for a possible role of CD8+ T cells in protection against vaginal candidosis. Clin Exp Immunol, v.131, n.1, Jan, p.26-33. 2003.
- Gonzalez, A., Gomez, B. L., Restrepo, A., Hamilton, A. J. e Cano, L. E. Recognition of extracellular matrix proteins by Paracoccidioides brasiliensis yeast cells. Med Mycol, v.43, n.7, Nov, p.637-45. 2005a.
- Gonzalez, A., Lenzi, H. L., Motta, E. M., Caputo, L., Sahaza, J. H., Cock, A. M., Ruiz, A. C., Restrepo, A. e Cano, L. E. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with Paracoccidioides brasiliensis conidia. Microbes Infect, v.7, n.4, Apr, p.666-73. 2005b.
- Gonzalez, A., Sahaza, J. H., Ortiz, B. L., Restrepo, A. e Cano, L. E. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental Paracoccidioides brasiliensis infection. Med Mycol, v.41, n.5, Oct, p.391-9. 2003.
- Greene, M. F., Haddow, J. E., Palomaki, G. E. e Knight, G. J. Maternal serum alpha-fetoprotein levels in diabetic pregnancies. Lancet, v.2, n.8606, Aug 6, p.345-6. 1988.
- Izacc, S. M., Gomez, F. J., Jesuino, R. S., Fonseca, C. A., Felipe, M. S., Deepe, G. S. e Soares, C. M. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis. Med Mycol, v.39, n.5, Oct, p.445-55. 2001.
- Kashino, S. S., Calich, V. L., Burger, E. e Singer-Vermes, L. M. In vivo and in vitro characteristics of six Paracoccidioides brasiliensis strains. Mycopathologia, v.92, n.3, Dec, p.173-8. 1985.
- Kashino, S. S., Fazioli, R. A., Cafalli-Favati, C., Meloni-Bruneri, L. H., Vaz, C. A., Burger, E., Singer, L. M. e Calich, V. L. Resistance to Paracoccidioides brasiliensis infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. J Interferon Cytokine Res, v.20, n.1, Jan, p.89-97. 2000.
- Kerr, I. B., Araripe, J. R., Oliveira, P. C. e Lenzi, H. L. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.30, n.5, Sep-Oct, p.336-50. 1988a.
- Kerr, I. B., De Oliveira, P. C. e Lenzi, H. L. Connective matrix organization in chronic granulomas of experimental paracoccidioidomycosis. Mycopathologia, v.103, n.1, Jul, p.11-20. 1988b.

- Knibbs, R. N., Perini, F. e Goldstein, I. J. Structure of the major concanavalin A reactive oligosaccharides of the extracellular matrix component laminin. Biochemistry, v.28, n.15, Jul 25, p.6379-92. 1989.
- Kurita, N., Oarada, M., Ito, E. e Miyaji, M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol, v.37, n.4, Aug, p.261-7. 1999.
- Kurita, N., Oarada, M., Miyaji, M. e Ito, E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol, v.38, n.2, Apr, p.177-82. 2000.
- Kurokawa, C. S., Sugizaki, M. F. e Peracoli, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.40, n.3, May-Jun, p.125-35. 1998.
- Lienqueo, M. E., Mahn, A., Navarro, G., Salgado, J. C., Perez-Acle, T., Rapaport, I. e Asenjo, J. A. New approaches for predicting protein retention time in hydrophobic interaction chromatography. J Mol Recognit, v.19, n.4, Jul-Aug, p.260-9. 2006.
- Lindell, D. M., Moore, T. A., Mcdonald, R. A., Toews, G. B. e Huffnagle, G. B. Generation of antifungal effector CD8+ T cells in the absence of CD4+ T cells during *Cryptococcus neoformans* infection. J Immunol, v.174, n.12, Jun 15, p.7920-8. 2005.
- Lopes, J. D., Moura-Campos, M. C., Vicentini, A. P., Gesztesi, J. L., De-Souza, W. e Camargo, Z. P. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. Braz J Med Biol Res, v.27, n.9, Sep, p.2309-13. 1994.
- Lourenco, E. V., Pereira, S. R., Faca, V. M., Coelho-Castelo, A. A., Mineo, J. R., Roque-Barreira, M. C., Greene, L. J. e Panunto-Castelo, A. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. Glycobiology, v.11, n.7, Jul, p.541-7. 2001.
- Mamoni, R. L. e Blotta, M. H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. Cytokine, v.32, n.1, Oct 7, p.20-9. 2005.
- Mamoni, R. L., Nouer, S. A., Oliveira, S. J., Musatti, C. C., Rossi, C. L., Camargo, Z. P. e Blotta, M. H. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. Med Mycol, v.40, n.2, Apr, p.153-9. 2002.
- Marques, A. F., Da Silva, M. B., Juliano, M. A., Travassos, L. R. e Taborda, C. P. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Antimicrob Agents Chemother, v.50, n.8, Aug, p.2814-9. 2006.
- Mcewen, J. G., Bedoya, V., Patino, M. M., Salazar, M. E. e Restrepo, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. J Med Vet Mycol, v.25, n.3, Jun, p.165-75. 1987a.

- Mcewen, J. G., Brummer, E., Stevens, D. A. e Restrepo, A. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis* [corrected]. Am J Trop Med Hyg, v.36, n.3, May, p.603-8. 1987b.
- Mendes-Giannini, M. J., Andreotti, P. F., Vincenzi, L. R., Da Silva, J. L., Lenzi, H. L., Benard, G., Zancope-Oliveira, R., De Matos Guedes, H. L. e Soares, C. P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbes Infect, v.8, n.6, May, p.1550-9. 2006.
- Mizoguchi, A. e Bhan, A. K. A case for regulatory B cells. J Immunol, v.176, n.2, Jan 15, p.705-10. 2006.
- Montenegro, M. R. e Franco, M. Pathology. In: Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo, A. e Del Negro, G. (Ed.). Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press, 1994. Pathology, p.131-150
- Mora, M., Donati, C., Medini, D., Covacci, A. e Rappuoli, R. Microbial genomes and vaccine design: refinements to the classical reverse vaccinology approach. Curr Opin Microbiol, v.9, n.5, Oct, p.532-6. 2006.
- Moscardi-Bacchi, M., Brummer, E. e Stevens, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. J Med Microbiol, v.40, n.3, Mar, p.159-64. 1994.
- Moscardi-Bacchi, M., Soares, A., Mendes, R., Marques, S. e Franco, M. In situ localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol, v.27, n.3, p.149-58. 1989.
- Mosmann, T. Complexity or coherence? Cytokine secretion by B cells. Nat Immunol, v.1, n.6, Dec, p.465-6. 2000.
- Mosmann, T. R. e Coffman, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol, v.7, p.145-73. 1989.
- Mota, N. G., Rezkallah-Iwasso, M. T., Peracoli, M. T., Audi, R. C., Mendes, R. P., Marcondes, J., Marques, S. A., Dillon, N. L. e Franco, M. F. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.79, n.6, p.765-72. 1985.
- Munk, M. E., Kajdacsy-Balla, A., Del Negro, G., Cuce, L. C. e Da Silva, W. D. Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol, v.30, n.4, p.317-21. 1992.
- Nascimento, F. R., Calich, V. L., Rodriguez, D. e Russo, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. J Immunol, v.168, n.9, May 1, p.4593-600. 2002.
- Negróni, R. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lutz's mycosis). Int J Dermatol, v.32, n.12, Dec, p.847-59. 1993.

Neworal, E. P., Altemani, A., Mamoni, R. L., Noronha, I. L. e Blotta, M. H. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. Cytokine, v.21, n.5, Mar 7, p.234-41. 2003.

Nilsson, B., Norden, N. E. e Svensson, S. Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin. J Biol Chem, v.254, n.11, Jun 10, p.4545-53. 1979.

Oliveira, S. J., Mamoni, R. L., Musatti, C. C., Papaiordanou, P. M. e Blotta, M. H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. Microbes Infect, v.4, n.2, Feb, p.139-44. 2002.

Panunto-Castelo, A., Freitas-Da-Silva, G., Bragheto, I. C., Martinez, R. e Roque-Barreira, M. C. Paracoccidioides brasiliensis exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. Microbes Infect, v.5, n.13, Nov, p.1205-11. 2003.

Parise-Fortes, M. R., Da Silva, M. F., Sugizaki, M. F., Defaveri, J., Montenegro, M. R., Soares, A. M. e Peracoli, M. T. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. Med Mycol, v.38, n.1, Feb, p.51-60. 2000.

Peracoli, M. T., Mota, N. G. e Montenegro, M. R. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster. Morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. Mycopathologia, v.79, n.1, Jul 23, p.7-17. 1982.

Pereira, M. D. S. F. O papel das células T CD4⁺ e CD8⁺ no mecanismo de indução e manutenção da proteção a *Paracoccidioides brasiliensis*. Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, 2006. 83 p.

Pina, A., Valente-Ferreira, R. C., Molinari-Madlum, E. E., Vaz, C. A., Keller, A. C. e Calich, V. L. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. Infect Immun, v.72, n.4, Apr, p.2369-78. 2004.

Popi, A. F., Lopes, J. D. e Mariano, M. GP43 from Paracoccidioides brasiliensis inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. Cell Immunol, v.218, n.1-2, Jul-Aug, p.87-94. 2002.

Puccia, R., Schenkman, S., Gorin, P. A. e Travassos, L. R. Exocellular components of Paracoccidioides brasiliensis: identification of a specific antigen. Infect Immun, v.53, n.1, Jul, p.199-206. 1986.

Racznik, G., Ibba, M. e Soll, D. Genomics-based identification of targets in pathogenic bacteria for potential therapeutic and diagnostic use. Toxicology, v.160, n.1-3, Mar 7, p.181-9. 2001.

Reis, B. S., Bozzi, A., Prado, F. L., Pereira, M. C., Ferreira, F. E., Godoy, P., Moro, L., Pedroso, E. P., Leite, M. F. e Goes, A. M. Membrane and extracellular antigens of Paracoccidioides brasiliensis (Mexo): identification of a 28-kDa protein suitable for

- immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. J Immunol Methods, v.307, n.1-2, Dec 20, p.118-26. 2005.
- Restrepo, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. Sabouraudia, v.23, n.5, Oct, p.323-34. 1985.
- Robledo, M. A., Graybill, J. R., Ahrens, J., Restrepo, A., Drutz, D. J. e Robledo, M. Host defense against experimental paracoccidioidomycosis. Am Rev Respir Dis, v.125, n.5, May, p.563-7. 1982.
- San-Blas, G. e San-Blas, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. Mycopathologia, v.62, n.2, Dec 16, p.77-86. 1977.
- Saraiva, E. C., Altemani, A., Franco, M. F., Unterkircher, C. S. e Camargo, Z. P. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin. J Med Vet Mycol, v.34, n.3, Jun-Jul, p.155-61. 1996.
- Severo, L. C., Geyer, G. R., Londero, A. T., Porto, N. S. e Rizzon, C. F. The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis. Mycopathologia, v.67, n.2, May 31, p.115-8. 1979.
- Shikanai-Yasuda, M. A., Pereira, P. M., Yamashiro-Kanashiro, E., Duarte, M. I., Assis, C. M., Geraldes, E. A. e Saldiva, P. H. Lung tissue mechanics in the early stages of induced paracoccidioidomycosis in rats. Braz J Med Biol Res, v.30, n.10, Oct, p.1175-9. 1997.
- Shikanai-Yasuda, M. A., Telles Filho Fde, Q., Mendes, R. P., Colombo, A. L. e Moretti, M. L. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. Rev Soc Bras Med Trop, v.39, n.3, May-Jun, p.297-310. 2006.
- Souto, J. T., Figueiredo, F., Furlanetto, A., Pfeffer, K., Rossi, M. A. e Silva, J. S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. Am J Pathol, v.156, n.5, May, p.1811-20. 2000.
- Souto, P. C., Brito, V. N., Gameiro, J., Da Cruz-Hofling, M. A. e Verinaud, L. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. Med Microbiol Immunol (Berl), v.192, n.4, Nov, p.225-9. 2003.
- Sugizaki, M. F., Peracoli, M. T., Mendes-Giannini, M. J., Soares, A. M., Kurokawa, C. S., Mendes, R. P., Marques, S. A. e Freire-Maia, D. V. Correlation between antigenemia of *Paracoccidioides brasiliensis* and inhibiting effects of plasma in patients with paracoccidioidomycosis. Med Mycol, v.37, n.4, Aug, p.277-84. 1999.
- Travassos, L. R., Puccia, R., Cisalpino, P., Taborda, C., Rodrigues, E. G., Rodrigues, M., Silveira, J. F. e Almeida, I. C. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. Arch Med Res, v.26, n.3, Autumn, p.297-304. 1995.
- Verli, F. D., Marinho, S. A., Souza, S. C., Figueiredo, M. A. e Yurgel, L. S. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop, v.38, n.3, May-Jun, p.234-7. 2005.

Vicentini, A. P., Gesztesi, J. L., Franco, M. F., De Souza, W., De Moraes, J. Z., Travassos, L. R. e Lopes, J. D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. Infect Immun, v.62, n.4, Apr, p.1465-9. 1994.

Vimr, E. e Lichtensteiger, C. To sialylate, or not to sialylate: that is the question. Trends Microbiol, v.10, n.6, Jun, p.254-7. 2002.

Vonlaufen, N., Naguleswaran, A., Gianinazzi, C. e Hemphill, A. Characterization of the fetuin-binding fraction of *Neospora caninum* tachyzoites and its potential involvement in host-parasite interactions. Parasitology, v.134, n.Pt 6, Jun, p.805-17. 2007.

Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T. e Mann, M. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. Nature, v.379, n.6564, Feb 1, p.466-9. 1996.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)