

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Pauline Christ Ledur

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE CÉLULAS  
DENDRÍTICAS PULSADAS COM ANTÍGENOS DE *Pythium*  
*insidiosum* SOBRE A RESPOSTA CELULAR *IN VITRO***

Santa Maria, RS  
2016

**Pauline Christ Ledur**

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PULSADAS  
COM ANTÍGENOS DE *Pythium insidiosum* SOBRE A RESPOSTA CELULAR *IN*  
*VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Janio Morais Santurio

Santa Maria, RS

**Pauline Christ Ledur**

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PULSADAS  
COM ANTÍGENOS DE *Pythium insidiosum* SOBRE A RESPOSTA CELULAR *IN*  
*VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS) como requisito  
parcial para obtenção do grau de **Mestre em  
Farmacologia**.

**Aprovado em 15 de Março de 2016:**

---

**Prof. Dr. Janio Morais Santurio (UFSM)  
(Presidente/Orientador)**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Bitencourt Rosa Leal (UFSM)**

---

**Prof. Dr. Érico Silva de Loreto (SOBRESP)**

Santa Maria, RS  
2016

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Renato e Ilse, por todo amor e cuidado a mim dedicados e por sempre terem me apoiado e incentivado na busca pelos meus sonhos, sempre prontos para me auxiliarem da melhor maneira que fosse possível.

As minhas irmãs, Rosana e Cristiane, e aos meus cunhados por toda amizade e apoio. Ao meu sobrinho Arthur, pequeno raio de sol nas nossas vidas, por sempre renovar minhas energias e esperanças com a sua alegria de criança.

Ao meu namorado, Rui Gabriel, por todo o amor, carinho e paciência, mas principalmente por ter estado ao meu lado, me apoiando nos momentos mais difíceis. Não tenho palavras para agradecer.

Ao professor Dr. Janio M. Santurio, por ter aberto as portas do seu laboratório e confiado a mim essa oportunidade. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado.

A professora Dra. Ivana da Cruz e a todos os amigos do Laboratório de Biogenômica, sempre lembrarei com muito carinho dos anos de iniciação científica com vocês.

A professora Dra. Daniela Leal e a Marcela, por toda ajuda na realização da citometria de fluxo e interpretação dos resultados.

A todos os colegas e amigos que conheci durante os anos em que morei em Santa Maria, principalmente ao Raul, Tális, Thaís e Micheli pela amizade.

A todos os colegas e amigos LAPEMI, principalmente à Camila, Thaísa, Karine, Carine, Fran, Laura e Fernanda pela amizade. Também quero muito agradecer à Juliana e ao Érico, que sempre se mostraram dispostos a me ajudar e dividiram comigo um pouco do seu conhecimento. Vocês foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

A todos que direta e indiretamente me ajudaram nesses dois anos, e que tornaram este trabalho possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM.

A CAPES pela bolsa de pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

# ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PULSADAS COM ANTÍGENOS DE *Pythium insidiosum* SOBRE A RESPOSTA CELULAR *IN VITRO*

AUTOR: Pauline Christ Ledur

ORIENTADOR: Janio Morais Santurio

A pitiose é uma doença severa causada pelo Oomiceto *Pythium insidiosum* que acomete animais e humanos. Se não diagnosticada e tratada rapidamente, a pitiose pode levar à morte do indivíduo acometido. O tratamento da pitiose é difícil, visto que ela não responde bem aos fármacos comumente utilizados em doenças fúngicas, devido à ausência de ergosterol na membrana de *P. insidiosum*. Devido a essa dificuldade no tratamento da pitiose com fármacos, uma abordagem terapêutica que vem sendo utilizada com sucesso é a imunoterapia. A hipótese mais aceita para a eficácia dos imunoterápicos na pitiose, é que eles são capazes de favorecer uma mudança na resposta imune no hospedeiro de Th2 para Th1, com produção de IFN- $\gamma$  e IL-2, o que causaria a ativação de mediadores de células mononucleares e consequente ativação de linfócitos T e macrófagos que destroem a hifa de *P. insidiosum*. Uma abordagem terapêutica que vem ganhando destaque é o uso de células dendríticas (DCs) como adjuvantes, visto que as DCs são capazes de induzir uma forte resposta imune celular. Neste cenário, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial aloestimulador e imunomodulador de células dendríticas pulsadas com diferentes antígenos de *P. insidiosum* sobre a resposta de células T humanas *in vitro*. Foram utilizadas DCs diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico humano, as quais foram sensibilizadas com o imunoterápico PitiumVac<sup>®</sup>,  $\beta$ -glucanas extraídas da parede de *P. insidiosum* e de zoósporos inativados por calor. Após a sensibilização com os antígenos, as DCs pulsadas foram co-cultivadas com linfócitos por 24 horas e realizou-se a quantificação das citocinas das respostas Th1, Th2 e Th17 a partir dos sobrenadantes celulares. Também foi analisada a proliferação dos linfócitos co-cultivados com as DCs sensibilizadas com os antígenos de *P. insidiosum* após 72 horas. Os resultados mostraram que DCs pulsadas com os zoósporos inativados por calor, as  $\beta$ -glucanas e o imunoterápico PitiumVac<sup>®</sup> eficientemente induzem a diferenciação das células T em um fenótipo Th, por meio da ativação de citocinas específicas da resposta Th1 *in vitro*. Os zoósporos inativados mostraram a maior resposta Th1 entre os grupos testados, com significativo aumento na produção das citocinas IL-6 e IFN- $\gamma$ . Estes resultados sugerem um potencial uso de DCs pulsadas com zoósporos de *P. insidiosum* inativados por calor como uma nova estratégia terapêutica no tratamento e aquisição de imunidade contra a pitiose.

**Palavras-chave:** Pitiose. Imunoterapia. Células dendríticas. *Pythium insidiosum*.  $\beta$ -glucanas.

## ABSTRACT

### IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS PULSED WITH DIFFERENT *P. insidiosum* ANTIGENS ON CELLULAR RESPONSE *IN VITRO*

AUTHOR: Pauline Christ Ledur

ADVISOR: Janio Morais Santurio

Pythiosis is a severe disease caused by the Oomycete *Pythium insidiosum* which can affect animals and humans. If not diagnosed and immediately treated, pythiosis can lead the affected host to death. Pythiosis treatment is difficult since it does not respond well to drugs commonly used in fungal diseases due to the lack of ergosterol in *P. insidiosum* cell wall. Due to this difficulty in pythiosis treatment with drugs, a therapeutic approach that is being successfully used is immunotherapy. The most accepted hypothesis to explain immunotherapy success is that they can switch host's immune response from a Th2 to a Th1 response, with IFN- $\gamma$  and IL-2 production, which activate mononuclear cells mediators as an immune response composed of T lymphocytes and macrophages which destroy *P. insidiosum* hyphae. A therapeutic approach that is gaining importance is the use of dendritic cells (DCs) as adjuvant, since DCs are capable of prime a strong cellular response. In this scenario, the aim of this study was to evaluate the stimulatory and immunomodulatory effects of DCs pulsed with different *P. insidiosum* antigens in human Th response *in vitro*. Peripheral blood monocytes were differentiated into DCs, which were pulsed with the immunotherapeutic PitiumVac<sup>®</sup>,  $\beta$ -glucans extracted from *P. insidiosum* cell wall, and Heat-inactivated (HI) zoospore. After sensitization, DCs pulsed with the tested antigens were co-cultured with lymphocytes for 24 hours and the supernatant was used to quantify the Th1, Th2 and Th17 cytokines produced. We also analyzed the proliferative rate of lymphocytes cultured with the pulsed DCs after 72 hours of incubation. Our results showed that DCs pulsed with *P. insidiosum* HI zoospores,  $\beta$ -glucans and the immunotherapeutic PitiumVac<sup>®</sup> efficiently induced T cell differentiation in a Th1 phenotype by the activation of specific Th1 cytokines production *in vitro*. HI zoospores showed the highest Th1 response among the tested groups, with a significant increase in IL-6 and IFN- $\gamma$  production. These results suggest a potential use of DCs pulsed with *P. insidiosum* heat-inactivated zoospores as a new therapeutic strategy in the treatment and acquisition of immunity against pythiosis.

**Key-words:** Pythiosis. Immunotherapy. Dendritic cells. *Pythium insidiosum*.  $\beta$ -glucans.

## LISTA DE FIGURAS

### MANUSCRITO

- Figure 1 - Cell proliferation of naïve T cells co-cultured with pulsed DCs..... 47
- Figure 2 - Determination of the concentrations of Th1-, Th2- and Th17-type cytokines..... 48

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AAC	Antígenos de Apresentação Celular
AmB	AnfotericinaB
cDC	Células dendríticas convencionais
CGM	<i>Complete growth medium</i> (Meio completo de crescimento)
CLR	Receptores de Lectina C
DCs	Células dendríticas
G	$\beta$ -glucanas
HI	<i>Heat-inactivated</i> (Inativado por calor)
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacardeo
NK	<i>Natural Killer</i>
P	PitiumVac <sup>®</sup>
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Cadeia de Reação da Polimerase
pDC	Células dendríticas plasmocitóides
PRR	Receptores de Reconhecimento Padrão
RNA	cido ribonucléico
Th	<i>T helper</i> (T auxiliar)
TLR	Receptores <i>Toll-Like</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Z	Zosporos inativados por calor



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1 <i>Pythium insidiosum</i> : AGENTE ETIOLÓGICO DA PITIOSE .....	10
<b>1.1.1 Histórico e classificação taxonômica</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1.2 Características morfológicas e ciclo biológico</b> .....	<b>11</b>
1.2 A PITIOSE .....	12
<b>1.2.1 Aspectos epidemiológicos</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2.2 Aspectos clínicos</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2.3 Diagnóstico</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2.4 Tratamento farmacológico</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2.5 Imunoterapia como terapia curativa na pitiose</b> .....	<b>17</b>
1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS .....	18
<b>1.3.1 Formação e diferenciação das células dendríticas</b> .....	<b>18</b>
<b>1.3.2. Papel das células dendríticas na imunidade celular inata e adquirida</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3.3. Receptores das células dendríticas</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3.4. Células dendríticas: indução da resposta Th</b> .....	<b>21</b>
1.4 IMUNOMODULADORES .....	22
<b>1.4.1 Imunoterápicos</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4.2 Vacinas</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4.3 <math>\beta</math>-glucanas</b> .....	<b>24</b>
<b>1.4.5. Imunoterapia com células dendríticas</b> .....	<b>25</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3 MANUSCRITO</b> .....	<b>28</b>
<b>Human DCs pulsed with <i>Pythium insidiosum</i> <math>\beta</math>-glucans, Heat-inactivated zoospores and PitiumVac<sup>®</sup> prime naïve T cells to Th1 differentiation <i>in vitro</i></b> .....	<b>28</b>
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>49</b>

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. O item Conclusões, encontrado no final desta dissertação, apresenta comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As referências referem-se somente às citações que aparecem no item Introdução desta dissertação. As referências utilizadas para a composição do manuscrito estão apresentadas ao final do próprio manuscrito.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica *Vaccine*, na qual se encontra submetido.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Pythium insidiosum*: AGENTE ETIOLÓGICO DA PITIOSE

#### 1.1.1 Histórico e classificação taxonômica

O primeiro relato de *Pythium insidiosum* parece ser a descrição de um microrganismo com características fúngicas isolado de lesões em equinos na Índia, no final do século XIX, realizado por cientistas ingleses (SMITH, 1884). Contudo, no início do século XX foram realizados os primeiros relatos científicos do microrganismo, nesse momento denominado *Hyphomycosis destruens*, isolado a partir de lesões de equinos na Indonésia (DE HAAN; HOOBKAMER, 1901). Todavia, somente em 1974 o microrganismo foi classificado, após a observação de produção de zoósporos quando em meio líquido, sendo classificado como um Oomiceto da família *Pythiaceae*, ordem Peronosporales, denominado *Pythium insidiosum* (AUSTWICK; COPLAND, 1974).

Inicialmente, houve relatos de diferentes espécies de *Pythium* causando infecções em equinos, nesses relatos o microrganismo foi chamado de *P. gracile* (ICHITANI; AMEMIYA, 1980) e *P. destruens* (SHIPTON, 1987). Porém, em 1987, concluiu-se que se tratava do mesmo microrganismo ao analisarem isolados de equinos, bovinos, cães e humanos provenientes de diferentes locais (DE COCK et al., 1987). Em 1989, com base em provas sorológicas, finalmente concluiu-se que essa espécie realmente tratava-se do mesmo microrganismo identificado anteriormente (MENDOZA; MARIN, 1989) que foi definitivamente denominado de *P. insidiosum*.

O agente etiológico da pitiose, *P. insidiosum*, está classificado no reino Straminipila, classe Peronosporomycetes (=Oomycetes), ordem Pythiales e família Pythiaceae. Segundo estudos taxonômicos mais detalhados baseados no sequenciamento de RNA ribossomal, os oomicetos estão mais proximamente relacionados com as algas marrons e com diatomáceas do que com os fungos (ADHIKARI et al., 2013). A família Pythiaceae é composta por um grupo de microrganismos aquáticos semelhantes aos fungos, que desenvolvem estruturas similares a hifas hialinas e zoósporos biflagelados em ambientes alagados. O gênero *Pythium* compreende 127 espécies, dentre as quais se encontram alguns dos mais destrutivos patógenos de plantas (LEVESQUE; DE COCK, 2004), sendo que até pouco tempo atrás, *P. insidiosum* era a única espécie conhecida deste gênero a atingir animais (MENDOZA et al.,

2003). No entanto, em 2011, um patógeno típico de plantas, *P. aphanidermatum*, foi isolado da perna de um soldado ferido no Iraque (CALVANO et al., 2011).

### 1.1.2 Características morfológicas e ciclo biológico

Dentre as principais características diferenciais do gênero *Pythium* estão: reprodução assexuada por meio da produção de zoósporos biflagelados (MENDOZA; VILELA, 2013); reprodução sexuada oogâmica; parede celular composta de  $\beta$  (1,3) e  $\beta$  (1,6) glucanas, celulose e hidroxipolina; talo diplóide; mitocôndria com crista tubular e características moleculares e bioquímicas peculiares, como a rota alternativa para a via de síntese da lisina (ALEXOPOULOS et al., 1996; MOORE-LANDECKER, 1996).

Diferentemente dos fungos, os oomicetos não possuem vias de síntese do ergosterol, principal esteroide de membrana dos fungos. Espécies dos gêneros *Pythium*, *Lagenidium* e *Phytophthora* incorporam os esteroides do ambiente (HENDRIX, 1964), dada a sua importância na produção de estruturas sexuadas, porém esses esteroides não são necessários para o crescimento vegetativo das hifas (GROOTERS, 2003). *P. insidiosum* é bem adaptado à temperatura corporal dos seus hospedeiros mamíferos, tendo temperatura ótima de crescimento na faixa de 34 – 36 °C (DE COCK et al., 1987). Para isolamento e cultivo em laboratório, *P. insidiosum* requer poucos nutrientes, sendo capaz de se desenvolver em vários meios de cultivo e em uma faixa de temperatura entre 25 e 45 °C (GAASTRA et al., 2010). Em meio Agar Sabouraud, *P. insidiosum* cresce submerso, em um padrão radial e irregular, em colônias esbranquiçadas a hialinas (DE COCK et al., 1987; MENDOZA et al., 1996; MENDOZA et al., 1993).

Geralmente *P. insidiosum* se desenvolve em áreas pantanosas e seu ciclo biológico baseia-se na colonização de plantas aquáticas que servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução do organismo, dando origem aos zoosporângios, os quais liberam os zoósporos (MENDOZA et al., 1993). Os zoósporos de *P. insidiosum* são células uninucleadas e sem parede celular que se movimentam na água em padrão helicoidal ou espiralado interrompido por mudanças de direção devido à presença de dois flagelos. Estas células não têm capacidade de se dividir ou multiplicar. Os zoósporos se movimentam na água até encontrarem outro organismo, planta ou animal, para então se encistar e emitir o tubo germinativo, dando origem a um novo micélio e completando assim o seu ciclo (MENDOZA et al., 1993).

Os zoósporos são reconhecidos como a forma infectante de *P. insidiosum*. Eles apresentam quimiotaxia por pelos e tecidos vegetais ou de mamíferos que transitam em regiões alagadas colonizadas pelo oomiceto, possibilitando a infecção quando em contato com tecido lesionado desses animais. Quando encistados, os zoósporos secretam em sua superfície uma glicoproteína que confere sua adesão ao tecido lesionado, permitindo a formação do tubo germinativo (MENDOZA et al., 1996). Além da infecção através de lesões cutâneas, outros autores sugerem a possibilidade de infecção através penetração dos zoósporos nos folículos pilosos (SANTURIO et al., 1998). *P. insidiosum* também já foi isolado em uma larva de mosquito *Culex quinquefasciatus* na Índia (SCHURKO et al., 2003).

## 1.2 A PITIOSE

### 1.2.1 Aspectos epidemiológicos

A pitiose tem sido descrita em regiões de clima tropical, subtropical e zonas temperadas (MENDOZA et al., 2003), onde a alta temperatura aliada à ambientes alagados favorecem o desenvolvimento de *Pythium insidiosum*, agente causador da doença (DE COCK et al., 1987). A pitiose atinge principalmente equinos, mas pode se desenvolver também em outros mamíferos, como bovinos, ovelhas, cães, gatos e inclusive em humanos (GAASTRA et al., 2010). A pitiose foi primeiramente descrita no final do século XIX, na Índia, onde cientistas ingleses observaram lesões aparentemente fúngicas em equinos, podendo ser este o primeiro relato de *P. insidiosum*. Essas lesões eram chamadas de “Bursattee”, termo que significa chuva, pois se acreditava que o aparecimento de granulomas estava relacionado com a época chuvosa, já que nesses períodos era observada uma maior incidência das lesões características dessa infecção (SMITH, 1884).

Embora a pitiose acometa diferentes espécies de mamíferos, inclusive humanos, não há relatos de transmissão direta entre animais ou mesmo entre animais e humanos (GAASTRA et al., 2010), sendo que a infecção ocorre por meio de contato com zoósporos ambientais, não havendo predisposição por raça, idade ou gênero (MENDOZA et al., 1996). É possível observar algumas particularidades na prevalência da pitiose nas diferentes regiões onde é relatada. Os casos em humanos ocorrem principalmente no sudeste asiático, em especial na Tailândia (KRAJAEJUN et al., 2006; THIANPRASIT et al., 1996). Casos em equinos são observados na Oceania (MILLER; CAMPBELL, 1982) e América Central (MENDOZA et al., 1996; MENDOZA; ALFARO, 1986). Na América do Norte predominam

casos em cães (FISCHER et al., 1994; GROOTERS, 2003) e equinos (MENDOZA; NEWTON, 2005; WHITE et al., 2008), enquanto na América do Sul as espécies mais comumente infectadas são os bovinos (PEREZ et al., 2005; SANTURIO et al., 1998), ovinos (PESSOA et al., 2012; SANTURIO et al., 2008; UBIALI et al., 2013), caninos (NETO et al., 2010; PEREIRA et al., 2013) e equinos (ÁLVAREZ et al., 2010; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2014).

As hifas de *P. insidiosum* não apresentam capacidade de penetrar na pele saudável intacta de seus hospedeiros, o que sugere que lesões macro ou microscópicas são necessárias para a infecção ocorrer tanto em humanos como em animais (RAVISHANKAR et al., 2001). Também foi observada forte quimiotaxia dos zoósporos frente à pelos, ferimentos, soluções de continuidade e mucosa intestinal, bem como a adesão de zoósporos às bordas de cortes de pele, mas dificilmente à tecido íntegro (GROOTERS, 2003; MENDOZA et al., 1993). Os casos de pitiose estão associados ao contato humano ou animal com áreas onde ocorre acúmulo de água contendo zoósporos (banhados e lagos), frequentemente em estações chuvosas, com a formação de campos alagados e com temperatura ambiental entre 30 e 40°C, que favorece o desenvolvimento de *P. insidiosum* (LAMOUR; KAMOUN, 2009; MILLER; CAMPBELL, 1982; SANTURIO; FERREIRO, 2008).

### 1.2.2 Aspectos clínicos

Após contato com o hospedeiro, os zoósporos perdem os flagelos e encistam, liberando uma substância adesiva a fim de se fixar no tecido. Em seguida, ocorre a formação de tubo germinativo que penetra o tecido do hospedeiro dando início à infecção (MENDOZA et al., 1993; MENDOZA et al., 2003). Acredita-se que muitos hospedeiros mamíferos sejam resistentes à infecção causada por *P. insidiosum*, e somente alguns desenvolvem a doença que varia conforme o hospedeiro. Devido à ocorrência de poucos casos de pitiose em áreas endêmicas, é possível que uma resposta imune adequada seja capaz de eliminar o microrganismo dos tecidos (MENDOZA; VILELA, 2013). Mendoza e Newton (2005) sugerem que indivíduos suscetíveis à infecção por *P. insidiosum* sejam portadores de defeitos genéticos relacionados a receptores-chave da resposta imune. A ocorrência de reinfecção em animais tratados com sucesso contra a pitiose após um período livre da doença corrobora com essa hipótese (SANTOS et al., 2011).

#### 1.2.2.1 Pitiose em animais

Nos animais a pitiose caracteriza-se pela presença de lesões ulcerativas e piogranulomatosas (cutâneas e subcutâneas) ou profundas (viscerais), sendo os equinos os mais afetados (POOLE; BRASHIER, 2003). As lesões cutâneas são a principal forma de manifestação da doença em equinos, atingindo principalmente as extremidades distais dos membros e porção ventral do animal. Isso ocorre devido ao maior contato dessas regiões com água contaminada com zoósporos (CHAFFIN et al., 1995; FOIL, 1996). Uma das principais características da pitiose cutânea em equinos é a presença de massas ulcerativas granulomatosas, com bordas irregulares e hifas recobertas por células necróticas, os chamados “*kunkers*”, formados através de sucessivas degranulações eosinofílicas sobre as hifas de *P. insidiosum*, aumentando e moldando sua estrutura (MEIRELES et al., 1993; MENDOZA; ALFARO, 1986).

Além das lesões cutâneas, as lesões intestinais são a segunda forma mais frequente da infecção em equinos, com presença de massas teciduais que levam a redução e até mesmo obstrução do lúmen intestinal (PEREIRA et al., 2013). Outros tecidos também podem ser afetados secundariamente às lesões cutâneas, incluindo lesões ósseas adjacentes à lesão primária (ALFARO; MENDOZA, 1990). Também já foram relatados casos de metástase via linfática para os pulmões e linfonodos regionais, que foram encontrados inclusive em coelhos infectados experimentalmente (CHAFFIN et al., 1995; JESUS et al., 2015b).

Os caninos têm a segunda maior incidência de casos da pitiose (DYKSTRA et al., 1999), também nas formas cutânea e gastrointestinal. Porém a forma gastrointestinal é mais prevalente, com formação de grandes massas nodulares nas paredes do estômago e intestino, compostas por inflamação granulomatosa e piogranulomatosa com áreas de necrose, intenso infiltrado eosinofílico e presença de hifas, podendo atingir também o trato digestivo superior (FISCHER et al., 1994; PEREIRA et al., 2013). Já as lesões cutâneas apresentam-se como dermatite piogranulomatosa ulcerativa, contendo áreas de necrose infiltrada por neutrófilos e macrófagos e granulomas eosinofílicos (HOWERTH et al., 1989; MARTINS et al., 2012).

Também são relatados casos da doença em bovinos (SANTURIO et al., 1998; THOMAS; LEWIS, 1998), felinos (THOMAS; LEWIS, 1998), ovinos (BERNARDO et al., 2015; TABOSA et al., 2004) e esporadicamente em animais silvestres mantidos em cativeiro em zoológicos (CAMUS et al., 2004; GROOTERS, 2003) e um único relato em uma ave (PESAVENTO et al., 2008).

#### 1.2.2.2 Pitiose em humanos

A maior incidência de casos de pitiose em humanos é registrada na Tailândia, onde a doença é endêmica. As principais formas de manifestação da doença em humanos, em ordem decrescente de importância, são a pitiose vascular, ocular, cutânea e subcutânea e sistêmica ou disseminada, com invasão dos órgãos internos (KRAJAEJUN et al., 2006). Nos casos de pitiose cutânea, vascular e sistêmica, há uma forte associação desta patologia com doenças hemolíticas, principalmente a talassemia. Já nos casos de pitiose ocular, não existem relatos dessa associação. Em humanos, a pitiose é considerada uma doença grave, que devido ao difícil tratamento, leva principalmente à enucleação, amputação dos membros acometidos e muitas vezes causa a morte do indivíduo (IMWIDTHAYA, 1994; 1995; KRAJAEJUN et al., 2006; LAOHAPENSANG et al., 2009).

O diagnóstico precoce da pitiose humana normalmente é dificultoso devido ao desconhecimento da doença pelos profissionais da saúde e pelos padrões clínicos e histológicos que confundem o agente com fungos como os zigomicetos (KAUFMAN, 1998; MENDOZA et al., 2004). Na Tailândia a pitiose está associada ao trabalho rural em plantações alagadiças, ideais para o desenvolvimento de zoósporos (PRASERTWITAYAKIJ et al., 2003), uma vez que o agente já foi isolado de amostras ambientais em áreas cultivadas (SUPABANDHU et al., 2008).

Casos esporádicos de pitiose humana já foram relatados em outros países, como Estados Unidos (SCHLOEMER et al., 2013; SHENEP et al., 1998), Austrália, Haiti, Malásia, Nova Zelândia e Jamaica (GAASTRA et al., 2010; PAN et al., 2014), além de um caso relatado no Brasil (BOSCO, 2005). Assim como nos casos relatados na Tailândia, a maioria dos casos de pitiose está relacionada à agricultura em regiões alagadas e irrigadas e atividades de recreação em água parada.

### **1.2.3 Diagnóstico**

O diagnóstico precoce da pitiose é essencial para o sucesso do tratamento da doença. Tradicionalmente, o diagnóstico é feito pelos aspectos clínicos, histopatológicos e pelo isolamento e identificação do agente através de suas características morfológicas e reprodutivas. Na avaliação microscópica com emprego de KOH 10% (exame direto), realizada geralmente de raspados ou swabs de casos de ceratite, observa-se *P. insidiosum* desenvolvendo hifas hialinas e eventualmente septadas, morfologia que facilmente pode ser confundida com a maioria dos fungos filamentosos (MENDOZA; VILELA, 2009). O exame



histopatológico é auxiliar e necessita de outros indicativos para confirmação. Atualmente métodos como imunohistoquímica e técnicas sorológicas auxiliam e suportam um diagnóstico precoce e preciso da pitiose (KEERATIJARUT et al., 2013; SANTURIO et al., 2006b).

O diagnóstico imunológico, pela técnica de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), possibilita a detecção de infecções precoces ou ainda subclínicas, além de ser útil no monitoramento da resposta à terapia (KRAJAEJUN et al., 2002; MENDOZA et al., 1997). Testes de ELISA para detecção da pitiose em equinos, caninos, felinos, humanos, bovinos e ovinos já foram desenvolvidos para diagnóstico precoce (SANTURIO et al., 2006b). Existem ainda as técnicas moleculares como importante ferramenta para o diagnóstico e identificação de *Pythium insidiosum*, principalmente através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MENDOZA; NEWTON, 2005).

#### 1.2.4 Tratamento farmacológico

Atualmente, o tratamento mais utilizado para a pitiose é a excisão cirúrgica, tanto em animais como em humanos (GAASTRA et al., 2010), porém essa forma de tratamento apresenta bons resultados apenas em lesões pequenas e superficiais, onde seja possível a retirada de toda área afetada, já que a permanência de fragmentos de hifa pode acarretar em recidiva da doença (SANTURIO et al., 2006a).

Já o tratamento da pitiose com o uso de fármacos apresenta resultados contraditórios. Os fármacos comumente usados no tratamento da doença até o momento foram a anfotericina B, cetoconazol, miconazol, fluconazol e itraconazol, além dos compostos iodínicos como iodeto de potássio e sódio (SANTURIO et al., 2006a). Devido à ausência de ergosterol em sua membrana, é esperado que *P. insidiosum* não apresente sensibilidade a agentes antifúngicos (MENDOZA; NEWTON, 2005), porém estudos de suscetibilidade *in vitro* tem demonstrado sinergismo entre AmB + terbinafina (CAVALHEIRO et al., 2009b), terbinafina + antifúngicos azólicos e terbinafina + caspofungina (CAVALHEIRO et al., 2009a). Estudos demonstram que o tratamento com o inibidor da síntese de  $\beta$ -glucana, caspofungina, reduz a lesão causada por pitiose em modelo experimental, porém foi observado retorno do desenvolvimento da lesão ao final da terapia (PEREIRA et al., 2007).

Além disso, estudos com antibacterianos que atuam na inibição da síntese protéica, como macrolídeos, tetraciclina e gliciciclina, têm demonstrado sucesso em testes *in vitro* (LORETO et al., 2014a; MAHL et al., 2012). Também foram encontrados resultados positivos em associações entre fármacos antifúngicos e antibacterianos e compostos fenólicos

timol e carvacrol em testes de suscetibilidade *in vitro*. Foi observado sinergismo elevado nas associações de claritromicina + micafungina (73,33%), minociclina + claritromicina ou azitromicina (93,3%), minociclina + tigeciclina (86,67%) e itraconazol + timol ou carvacrol (96,6%) (JESUS et al., 2015a; JESUS et al., 2014) e em testes *in vivo* e em pitiose induzida experimentalmente com a associação de minociclina e azitromicina (4/6 animais) e na monoterapia com azitromicina (5/6 animais) (JESUS et al., 2015b). A terapia fotodinâmica também é uma alternativa a ser estudada, uma vez que demonstrou bons resultados em zoósporos de *P. insidiosum* tratados *in vitro* (PIRES et al., 2014).

### 1.2.5 Imunoterapia como terapia curativa na pitiose

A imunoterapia já vem sendo usada há mais de 25 anos para o tratamento da pitiose equina (GAASTRA et al., 2010), sendo uma abordagem terapêutica que vem obtendo sucesso no tratamento da doença. O primeiro imunoterápico para a pitiose equina foi produzido a partir do micélio ultrassonicado de *P. insidiosum*, tendo sido efetivo em metade dos animais tratados (MILLER, 1981). Desde então outras formulações tem sido testadas com certo sucesso (MENDOZA; ALFARO, 1986; MENDOZA et al., 2003) inclusive em cães (HENSEL et al., 2003; PEREIRA et al., 2013). No Brasil, existe atualmente um imunoterápico para pitiose equina testado inicialmente em coelhos com pitiose induzida experimentalmente, constituído de micélio inativado, macerado e liofilizado (SANTURIO et al., 2003), denominado PitiumVac<sup>®</sup>, produzido pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI/UFSM) em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-Pantanal).

Em humanos a imunoterapia foi usada com sucesso pela primeira vez em um menino tailandês com pitiose vascular que não respondeu à cirurgia e terapia com drogas antifúngicas (THITITHANYANONT et al., 1998) e vem sendo usada como último recurso em casos onde não há resposta aos tratamentos tradicionais (SUDJARITRUK; SIRISANTHANA, 2011; WANACHIWANAWIN et al., 2004).

A hipótese que melhor explica o sucesso dos imunoterápicos no tratamento da pitiose baseia-se em dados de humanos e equinos. Uma vez que os zoósporos de *P. insidiosum* entram em contato com o hospedeiro, estes se estabelecem e formam hifas, as quais liberam exoantígenos denominados de antígenos de apresentação celular (AAC). Os AAC liberam interleucina 4 (IL-4), que estimulam a diferenciação dos linfócitos T auxiliar (Th0) em linfócitos Th2, que por sua vez induzem a produção de mais IL-4 e IL-5. A IL-4 regula a

expressão de Th1 e estimulando, por sua vez, células B para produção de IgE, IgM e IgG que podem ser detectadas por testes de diagnóstico. A IL-5 e IgE desencadeiam a mobilização de eosinófilos e mastócitos para o local da lesão. Estas células vão degranular sobre as hifas de *P. insidiosum*, o que mais tarde irá desenvolver os “kunkers” na pitiose equina. As hifas de *P. insidiosum* multiplicam-se no interior dos “kunkers” onde produzem exoantígenos em grande quantidade, o que bloqueia a resposta imune devido à indução de Th2. Quando os imunógenos do imunoterápico são injetados no hospedeiro com pitiose, os antígenos nele presentes são distintos daqueles da infecção natural. Estes liberam interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) que ativam a diferenciação de Th0 para Th1. O Th1 ativado produz mais INF- $\gamma$  e também IL-2. Por sua vez, IL-2 e INF- $\gamma$  irão ativar mediadores de células mononucleares como resposta imune composta por linfócitos T e macrófagos que destroem a hifa de *P. insidiosum*. A produção de INF- $\gamma$ , no local da infecção irá resultar em uma menor formação de Th2. Portanto, a ativação de Th1 e o bloqueio de Th2 poderiam explicar porque organismos com pitiose são curados após administração de imunoterápicos (LORETO et al., 2014b; MENDOZA et al., 2003; MENDOZA; NEWTON, 2005; SANTURIO et al., 2006a).

### 1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS

#### 1.3.1 Formação e diferenciação das células dendríticas

As células dendríticas (DCs) foram descritas inicialmente por Steinman & Cohn (1973) e pelos mesmos autores cuidadosamente caracterizadas (STEINMAN et al., 1975; STEINMAN; COHN, 1974; STEINMAN et al., 1979; STEINMAN et al., 1974), representam um grupo heterogêneo de células encontradas em todos os órgãos linfóides, bem como próximas de tecidos não-linfóides e órgãos, particularmente em sítios próximos ao meio ambiente extracorpóreo, compreendendo 1 a 2% das células totais (BANCHEREAU et al., 2000).

As DCs apresentam três estágios de diferenciação: precursoras, imaturas e maduras. As DCs precursoras e imaturas originam-se continuamente de células progenitoras na medula óssea e são liberadas para os tecidos por meio do sangue. Dependendo da origem de seu desenvolvimento, das citocinas ativadoras, dos antígenos de superfície e da capacidade funcional, as DCs podem ser subdivididas em duas populações distintas: convencionais (cDCs) e plasmocitóides (pDCs) (SHORTMAN; NAIK, 2007).

As cDCs compreendem as células de Langerhans encontradas no epitélio estratificado da pele e DCs intersticiais, encontradas em todos os outros tecidos (CAUX et al., 2000). As pDCs são geradas em linha com a via linfóide. Estas células são fortes indutoras da imunidade citotóxica e secretam grande quantidade de interferons do tipo 1 (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) (MCKENNA et al., 2005). Um terceiro tipo de DC foi descrito em 2006, com perfil de expressão molecular duplo de células *natural killers* (NK) e DCs, as quais foram designadas de DCs *killers* produtoras de INF devido a sua habilidade de produzir grande quantidade de interferon do tipo 1 e matar as células alvo (via apoptose) através do fator de necrose tumoral (TNF) (CHAN et al., 2006; TAIEB et al., 2006).

### **1.3.2. Papel das células dendríticas na imunidade celular inata e adquirida**

Na ausência de resposta inflamatória as DCs constantemente monitoram os tecidos linfáticos e periféricos e os órgãos linfóides secundários, buscando invasores (patógenos), que quando encontrados são internalizados por endocitose, macropinocitose ou fagocitose (SABATTE et al., 2007). A grande competência na captura de antígenos pelas DCs imaturas está relacionada não só à sua alta capacidade endocítica, mas também ao fato de que estão estrategicamente localizadas em locais anatômicos freqüentemente expostos a antígenos, como a pele, mucosas e o baço (GUERMONPREZ et al., 2002).

A fase inicial de defesa do hospedeiro contra microorganismos invasores depende dos mecanismos da imunidade inata, uma forma evolucionária antiga e universal de proteção do hospedeiro. A neutralização do patógeno está associada com o reconhecimento de antígenos pelo sistema imune inato, que envolve a integração entre células do estroma presentes nos tecidos de revestimento do corpo, tais como as células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais, assim como por células migratórias mais especializadas do sistema imunológico, tais como células NK, granulócitos, macrófagos e DCs, resultando em um processo inflamatório que destrói o patógeno (GORDON, 2002; IWASAKI; MEDZHITOV, 2010).

No entanto, nos animais vertebrados, o patógeno pode encontrar brechas nesta linha protetora, tornando-se necessária a formação e ativação de linfócitos T-*helper* (Th) antígeno-específico e linfócitos B que reconhecem sítios específicos do microrganismo, eliminando-o e formando memória celular protetora às infecções subsequentes (imunidade adaptativa) (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010). Esta tarefa crítica de ativação dos linfócitos Th é realizada pelas DCs, que não só estimulam as células T-*naïve* com antígenos microbianos capturados nos tecidos periféricos ou localmente, mas também orquestram a resposta imune

protetora através da expressão de células T co-estimulatórias e moléculas de polarização que promovem o desenvolvimento de uma resposta imunológica apropriada e mediada por células (ROMANI, 2011).

As DCs adquirem antígenos nos tecidos periféricos na sua forma imatura. No início da infecção, a presença de patógenos, inflamação ou lesão tecidual induz a maturação das DCs. À medida que maturam, as DCs migram às áreas dos órgãos linfoides que contém células T, onde estes traduzem as informações provenientes dos tecidos em sinais apropriados para a resposta imunológica (REIS E SOUSA et al., 1999). Os sinais para a maturação podem ser derivados do hospedeiro (CD40, TNF, IL-1, IL-6, IFN- $\alpha$ ) ou por estruturas microbianas e moléculas liberadas pelos tecidos danificados, o que estimula os receptores *Toll-like* (TLR) localizados nas DCs (CHENG et al., 2003). Este processo de maturação é acompanhado pela reorganização do citoesqueleto, redução da atividade fagocítica, aquisição de motilidade celular, migração para os tecidos linfoides e consequente ativação de células T (ADAMS et al., 2005).

Desta forma, as DCs apresentam dupla função, de acordo com seu grau de maturação: DCs imaturas capturam antígenos enquanto que DCs maduras ativam linfócitos. Assim, as DCs são cruciais como moduladores da consequente resposta imune: representam uma ligação entre o sistema imune inato e o adaptativo, uma vez que transferem informações importantes sobre o patógeno invasor e sobre a resposta imune inata da periferia para as células T, resultando em uma resposta imune adequada (PULENDRAN et al., 2001; ROY; KLEIN, 2012; STEINMAN, 2012; WALSH; MILLS, 2013).

### **1.3.3. Receptores das células dendríticas**

As DCs expressam membros das duas famílias mais importantes de receptores de reconhecimento padrão (PRR): receptores *Toll-like* (TLR) e receptores lectina do tipo C (CLR). Os TLR geralmente reconhecem moléculas microbianas evolucionariamente conservadas, tais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, de acordo com seus constituintes. Todos os ligantes TLR funcionam como adjuvantes imunológicos que levam à ativação de DCs e consequente produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 e TNF- $\alpha$ , as quais contribuem para a indução da resposta imune inata local (GORDON, 2002; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; KAISHO; AKIRA, 2006). Os CLR, em contraste, reconhecem vários sacarídeos tais como D-manose, L-fucose e *N*-acetilglicosamina presentes

na superfície do patógeno e sua principal função é internalizar antígenos para o posterior processamento e apresentação pelas DCs (MCGREAL et al., 2005).

Subconjuntos diferentes de DCs expressam conjuntos distintos de TLR e isto representa a base para suas funções específicas na resposta imune inata e ativação de subconjuntos distintos de células T. Desta forma, diferentes TLRs induzem a ativação de subconjuntos diferentes de DCs a secretarem diferentes citocinas (BOONSTRA et al., 2003). No entanto, em alguns casos, o mesmo TLR em cada subconjunto de DCs induz diferentes citocinas. Por exemplo, a estimulação de pDCs humanas através do TLR7 induz a secreção de IFN- $\alpha$ , enquanto que a mesma estimulação em cDCs induz a secreção de IL-12 (ITO et al., 2002). Resultados semelhantes foram observados com a estimulação de TLR9 em camundongos (HEMMI et al., 2003). Estas observações sugerem que a interação de um dado TLR com estímulos alternativos pode conduzir à indução de respostas diferentes (MOLL, 2003).

#### **1.3.4. Células dendríticas: indução da resposta Th**

As DCs maduras induzem a resposta celular com células T nos órgãos linfoides secundários, resultando na expansão clonal e na diferenciação em células Th1, Th2 ou Th17, as quais podem ser diferenciadas de acordo com as citocinas produzidas por estas células (HARRINGTON et al., 2006). As citocinas produzidas em consequência da estimulação das DCs são elementos essenciais na determinação do tipo de resposta Th. As IL-12, IL-18, IL-23 e IL-27 polarizam as células T para Th1, enquanto que a IL-4 ou a ausência de IL-12 desvia a resposta para Th2. IL-1 $\beta$  (Interleucina-1 $\beta$ ), juntamente com a IL-6 induz a diferenciação de células T produtoras de IL-17 (ROMANI, 2011).

As citocinas e outros mediadores químicos desempenham um papel importante no processo imunológico e podem determinar o tipo de resposta inflamatória gerada relacionada com o patógeno. Para limitar as consequências patológicas de um processo inflamatório excessivo, o sistema imune dispõe de mecanismos protetores, incluindo a regulação entre a resposta Th1 e Th2, que pode ser realizada por citocinas tais como o interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina (IL) 4 e, também, pela geração de células T regulatórias (Treg) (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010; ROMANI, 2004; 2011; ROMANI et al., 2006; ROMANI; PUC CETTI, 2006).

As células Th1 produzem altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$ , citocinas que são fundamentais para a defesa contra patógenos intracelulares. Além disso, elas induzem a produção de anticorpos pelas células B do isotipo imunoglobulina (Ig) G2, que são responsáveis pela ativação de fagócitos e pela citotoxicidade celular dependente de anticorpos. As células Th2 produzem altos níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e induzem a produção de anticorpos IgE, que são responsáveis pela imunidade contra infecções por helmintos (MURPHY; REINER, 2002; NETEA et al., 2005). As células Th17 produzem IL-17 e IL-22, e estão relacionadas com a estimulação de células epiteliais na produção de proteínas antimicrobianas (anti-*Candida* e anti-*Staphylococcus*, por exemplo). As células Th17 em quantidade excessiva estão associadas com o desenvolvimento e persistência de doenças autoimunes (STOCKINGER; VELDHOEN, 2007; VELDHOEN et al., 2006).

A ativação destas respostas depende do tipo de agente infeccioso (estímulo). No entanto, os diferentes patógenos podem induzir o mesmo tipo de resposta imunológica (Th1, por exemplo) através de subconjuntos diferentes de DCs e concentrações diferentes de interleucinas. Além disso, diferentes formas do mesmo patógeno podem induzir as DCs a determinar diferentes respostas com células T. Por exemplo, a forma leveduriforme de *Candida albicans* induz uma resposta protetora Th1 através da estimulação da produção de IL-12 pelas DCs, enquanto que a forma de hifas inibe a formação de IL-12 e desencadeia uma resposta não-protetora Th2 (D'OSTIANI et al., 2000). Resultados similares são observados com conídios e hifas de *Aspergillus fumigatus* (BOZZA et al., 2002; BOZZA et al., 2003).

Tomadas em conjunto, todas estas condições sugerem que a capacidade de DCs para iniciar uma resposta Th1 efetiva ou uma resposta imune Th2 é o resultado de uma complexa rede de interações entre os subgrupos de DCs e da forma de sua maturação, o tipo de sinais microbianos, o tipo de sinais inflamatórios e antiinflamatórios e outros fatores ambientais e relacionados com o tecido (ADAMS et al., 2005).

## 1.4 IMUNOMODULADORES

### 1.4.1 Imunoterápicos

A imunoterapia tem por objetivo estimular o sistema imune do indivíduo, modificando a sua resposta. Por isso a imunoterapia vem sendo utilizada como uma ferramenta não invasiva para prevenir e tratar diversas doenças, como as doenças auto-imunes, o câncer e doenças infecciosas (ANGUILLE et al., 2015; ROY; KLEIN, 2012).

No caso da pitiose, a imunoterapia desenvolvida a partir de extratos protéicos obtidos de culturas de *P. insidiosum* representa uma alternativa não invasiva no tratamento da doença em humanos e animais. Em humanos foram observadas taxas de cura de até 55%, enquanto que em equinos, respostas favoráveis já foram descritas em mais de 70% dos casos, com os melhores resultados observados quando a doença encontra-se nos estágios iniciais (MENDOZA; NEWTON, 2005; SANTURIO; FERREIRO, 2008).

O mecanismo proposto para o sucesso terapêutico da imunoterapia está baseado na mudança da resposta celular. A resposta imunológica observada na pitiose envolve inflamação eosinofílica e expressão de linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2), com liberação de interleucinas (IL-4 e IL-5), com mobilização de eosinófilos e mastócitos. Os antígenos do imunoterápico produzem a expressão de linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1), produção de IL 2 e interferon- $\gamma$ , com mobilização de linfócitos T e macrófagos que destroem as células de *P. insidiosum* (MENDOZA; NEWTON, 2005).

#### 1.4.2 Vacinas

As primeiras formulações de vacinas focavam na administração de agentes infecciosos vivos ou atenuados, capazes de gerar forte imunidade humoral e celular. Nos casos dos agentes vivos, problemas na produção ou armazenamento das vacinas poderiam resultar em reações adversas, incluindo a retomada da virulência pelo patógeno e desenvolvimento da doença, o que acabou por estimular o uso de microrganismos mortos para preparo de vacinas e indução de imunidade (GLENNY, 1925; PENNOCK et al., 2016).

Uma forte imunidade celular é crucialmente necessária para a vacinação terapêutica eficaz contra infecções crônicas e contra o câncer (BUDHU et al., 2010). Porém, a maioria dos novos adjuvantes de vacinas desenvolvidos até agora, não geram uma imunidade mediada por células clinicamente significativa (COFFMAN et al., 2010). Consequentemente tem sido observado um retorno para o estudo de agentes infecciosos e as respostas imunes celulares instigam (PENNOCK et al., 2016).

As vacinas anti-infecciosas preferencialmente induzem imunidade baseada na produção de anticorpos por meio de adjuvantes, como demonstrado em um recente estudo de vacina contra *Candida albicans* com um antígeno fúngico recombinante (SCHMIDT et al., 2012). Entretanto, os estudos sobre vacinação antifúngica sugerem a necessidade do



desenvolvimento de imunidade celular para o tratamento da maioria das infecções causadas por fungos (LIN et al., 2009; WUTHRICH et al., 2011)

### 1.4.3 $\beta$ -glucanas

As  $\beta$ -glucanas são polissacarídeos estruturais da parede celular principalmente de leveduras e fungos filamentosos, também encontrados em bactérias, algas e oomicetos zoospóricos como *P. aphanidermatum* e *P. insidiosum* (THOMPSON et al., 2010), que se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de glicose da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia (MCINTOSH et al., 2005). Elas são capazes de induzir uma série de efeitos que modulam o sistema imune inato e adaptativo (THOMPSON et al., 2010).

O interesse pelas propriedades biológicas das  $\beta$ -glucanas surgiu após a obtenção do zymosan, na década de 1950. O zymosan é um extrato insolúvel de propriedade imunoestimulante, derivado da parede celular de *S. cerevisiae*, rico em proteínas,  $\beta$ -glucana, quitina, mananas e lipídeos, sendo a  $\beta$ -glucana o constituinte biologicamente ativo (DI CARLO; FIORE, 1958; YANG; MARSHALL, 2009).

Nos vertebrados, a resposta às  $\beta$ -glucanas inicia após a ingestão ou contato do sistema imune com receptores de reconhecimento presentes na superfície celular de DCs, macrófagos, monócitos, linfócitos, neutrófilos e células *natural killer* (NK), além da indução da expressão de diversas citocinas. Os receptores para  $\beta$ -glucanas também estão presentes nas células não imunes como as endoteliais, fibroblastos e do epitélio alveolar (HUANG et al., 2009; MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

Como as  $\beta$ -glucanas não podem penetrar nas células devido ao seu peso molecular, a interação com o sistema imunológico ocorre através da ligação com receptores celulares como a lactosilceramida, receptores *Toll-Like* (TLR) e principalmente dectina-1 (BROWN, 2006; QI et al., 2011). Após, as vias de sinalização intracelular recebem estímulos e culminam na ativação, translocação e ligação de proteínas nucleares imunomoduladoras. O mecanismo de ação está relacionado ao peso molecular, tipo de ligações glicosídicas, resíduos presentes, solubilidade em água, conformação espacial e grau de polimerização das  $\beta$ -glucanas (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

Vários estudos têm demonstrado o potencial das  $\beta$ -glucanas como adjuvantes na indução uma potente resposta imune celular e adaptativa (LI et al., 2010). Essa ativação da resposta imune está relacionada com a interação com diferentes receptores celulares, podendo

variar de acordo com o receptor celular ativado (HUANG et al., 2009). A via da dectina-1 é essencial para a ativação de DCs por  $\beta$ -glucana particulada, fagocitose em macrófagos, diferenciação da resposta Th1 e de CLT (linfócitos T citotóxicos), e resposta imune antitumoral *in vivo* por  $\beta$ -glucana particulada (QI et al., 2011). Contudo, diferentes tipos de  $\beta$ -glucanas e proteínas isoladas de diferentes microrganismos demonstraram atuar de diferentes formas na diferenciação de células T (DILLON et al., 2006; HUANG et al., 2009; LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2008).

#### **1.4.5. Imunoterapia com células dendríticas**

As DCs são muitas vezes referidas como "adjuvantes naturais", pois têm a capacidade única de estimular células T *naïve* CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Desta forma, esta atividade especializada na ativação das células Th (T helper) e T killers (Tk) durante o início da resposta imune as torna as mais potentes células apresentadoras de antígeno (APC) do sistema imune. As DCs não apenas iniciam o sistema imune, mas também controlam e regulam o tipo de resposta, o que as tornam candidatas para novas estratégias imunoterápicas (FAJARDO-MOSER et al., 2008; STEINMAN, 2012; STEINMAN; HEMMI, 2006).

##### *1.4.5.1. Imunoterapia contra o câncer*

Desde que Inaba et al. (1990) demonstraram que a injeção de DCs pulsadas com antígenos *ex vivo* são capazes de sensibilizar camundongos com antígenos protéicos, diversos estudos demonstraram que as DCs induzem uma potente resposta antitumoral antígeno-específica e que podem proteger camundongos contra doses letais de células tumorais (LI et al., 2007; MAYORDOMO et al., 1995; TAKEDA et al., 2003). Em alguns casos a vacinação com DCs pulsadas com peptídeos foi suficiente para a cura de animais com tumores já instalados (CELLUZZI; FALO, 1998; FIGDOR et al., 2004). Baseado nestas pesquisas experimentais, testes clínicos usando imunoterapia com CDs demonstram grandes avanços no tratamento de tumores (BURGDORF et al., 2008; CONSTANTINO et al., 2016; JIN et al., 2009; KUWABARA et al., 2007; LESTERHUIS et al., 2004; MINARIK et al., 2010; MURTHY et al., 2009; TOH et al., 2009).

##### *1.4.5.2. Imunoterapia anti-infecçiosa*

Mbow et al. (1997) e Flohe et al. (1998) apresentaram as primeiras pesquisas mostrando o potencial da imunoterapia com DCs em modelos experimentais de infecções por *Borrelia burgdorferi* e *Leishmania major*. Desde então as DCs vem sendo investigadas como adjuvantes na imunoterapia em diversas infecções causadas por vírus, bactérias, fungos e parasitas (MOLL, 2004). De forma notável, apesar da grande heterogeneidade dentre os patógenos testados, as DCs pulsadas com antígenos microbianos são muito eficientes na indução de ambas as respostas, humoral e mediada por células T (FAJARDO-MOSER et al., 2008).

A imunoterapia com DCs demonstra avanços promissores na terapia anti-infecciosa, o que é observado em diversos estudos que comprovam o desenvolvimento de imunidade protetora contra infecções bacterianas (DEMANGEL et al., 1999; LU et al., 2010; LU; ZHONG, 1999; MBOW et al., 1997; PELUSO et al., 2010), virais (HENRIQUES et al., 2013; LOPEZ et al., 2000; SCHON et al., 2001; YU et al., 2007), fúngicas (BOZZA et al., 2004; BOZZA et al., 2003; CLAUDIA et al., 2002; D'OSTIANI et al., 2000; MAGALHAES et al., 2012; UENO et al., 2015) e parasitárias (AGALLOU et al., 2011; FALCON et al., 2011; FLOHE et al., 1998).

As análises dos parâmetros imunológicos das terapias anti-infecciosas demonstraram que a proteção está relacionada com a indução de um perfil Th eficiente no combate à infecção, o que está correlacionado com as DCs pulsadas com os antígenos microbianos, com o subconjunto de DCs e com a via de administração da imunoterapia (BACCI et al., 2002; FAJARDO-MOSER et al., 2008; FLOHE et al., 1998; REMER et al., 2007).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial aloestimulador e imunomodulador de células dendríticas pulsadas com diferentes antígenos de *Pythium insidiosum* sobre linfócitos humanos *in vitro*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ativação de células dendríticas pulsadas com  $\beta$ -glucana, PitiumVac<sup>®</sup> e zoósporos inativados;
- Avaliar a indução de proliferação de linfócitos co-cultivados com células dendríticas pulsadas com  $\beta$ -glucana, PitiumVac<sup>®</sup> e zoósporos inativados;
- Quantificar a produção de citocinas inflamatórias das respostas Th1, Th2 e Th17 em linfócitos estimulados com células dendríticas pulsadas com  $\beta$ -glucana, PitiumVac<sup>®</sup> e zoósporos inativados;

### 3 MANUSCRITO

#### **Human DCs pulsed with *Pythium insidiosum* $\beta$ -glucans, Heat-inactivated zoospores and PitiumVac<sup>®</sup> prime naïve T cells to Th1 differentiation *in vitro***

Pauline C. Ledur<sup>1</sup>, Juliana S. M. Tondolo<sup>1</sup>, Camila M. Verdi<sup>1</sup>, Érico S. Loreto<sup>1</sup>, Sydney H. Alves<sup>2</sup>, Janio M. Santurio<sup>1\*</sup>

Manuscrito submetido à revista *Vaccine* (ISSN 0264-410X).

**Human dendritic cells pulsed with *Pythium insidiosum*  $\beta$ -glucans,  
Heat-inactivated zoospores and PitiumVac<sup>®</sup> prime naïve T cells to Th1  
differentiation *in vitro***

Pauline C. Ledur<sup>1</sup>, Juliana S. M. Tondolo<sup>1</sup>, Camila M. Verdi<sup>1</sup>, Érico S. Loreto<sup>1</sup>,  
Sydney H. Alves<sup>2</sup>, Janio M. Santurio<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

**\* Corresponding author:**

Prof. Dr. Janio Morais Santurio (janio.santurio@gmail.com), Laboratório de Pesquisas Micológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Campus UFSM, Prédio 20, Sala 4139, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.  
Phone/Fax: + 55 55 3220 8906

**Abstract**

Pythiosis is a life-threatening disease caused by the fungus-like microorganism *Pythium insidiosum* that can lead to death if not treated. Since *P. insidiosum* has particular cell wall characteristics, pythiosis is difficult to treat, as it does not respond well to traditional antifungal drugs. In our study, we investigated a new immunotherapeutic approach with potential use in treatment and in the acquisition of immunity against pythiosis. Dendritic cells pulsed with *P. insidiosum* heat-inactivated zoospore,  $\beta$ -glucans and the immunotherapeutic PitiumVac<sup>®</sup> efficiently induced naïve T cell differentiation in a Th1 phenotype by the activation of specific Th1 cytokine production *in vitro*. Heat-inactivated zoospores showed the greatest Th1 response among the tested groups, with a significant increase in IL-6 (approximately 50x when compared to the control group) and IFN- $\gamma$  production (approximately 120x when compared to the control group). These results suggest a potential use of DCs pulsed with *P. insidiosum* heat-inactivated zoospores as a new therapeutic strategy in the treatment and acquisition of immunity against pythiosis.

**Keywords:** Pythiosis; Dendritic cells;  $\beta$ -glucan; Immunotherapy; Vaccine; Immune response.

## Introduction

Pythiosis is a severe disease, which can lead to death if not treated, caused by *Pythium insidiosum*, a zoosporic fungus-like microorganism belonging to the kingdom Straminipila, phylum Oomycota [1]. This infectious disease affects mainly mammals, and it is mostly recorded in horses and humans. Pythiosis can occur in different forms, the most common are cutaneous and subcutaneous, vascular, ocular, gastrointestinal and a systemic form, which is rarely seen [2-5]. Since pythiosis treatment with antifungal drugs is difficult due to the cell wall characteristics of *P. insidiosum*, the most effective treatment strategy is surgical removal and immunotherapy, together or independently [2, 6]. Immunotherapeutic approach has an efficacy of approximately 80% in equine pythiosis [7] and only 50% in human cases [4]; therefore, it is important to investigate a vaccine that provides a better rate of cure together with immunity against pythiosis, because immunotherapy successfully treats the disease but does not provide immunity to new infections [8].

Dendritic cells (DCs) are the most effective antigen-presenting cells (APC) and play a key role in the regulation of innate and adaptive immunity [9], which is crucial for antifungal defense. DCs are capable of taking up and processing antigens for presentation by major histocompatibility complex (MHC) to naïve T cells, driving naïve CD4<sup>+</sup> T cell differentiation into a T helper (Th) phenotype [10, 11]. Cytokines and other mediators play an essential role in this process and may determine the type of effector response that is generated by the pathogen [12, 13]. IFN- $\gamma$  potently induces Th1 differentiation, and IL-4 is important for the induction of Th2 differentiation. Differentiation into Th17 cells requires the presence of IL-6, whereas the presence of IL-10 indicates Treg response with a suppressor function [14]. The Th subtypes that correlate best with protection against fungi are Th1 and Th17 [13].

Because DCs provide an interface between innate and adaptive immunity, they can serve as a unique vehicle for vaccination [12]. The induction of strong cellular immunity via



the appropriate activation of DCs is the first step in the host's resistance to fungi [13]. In animal models, DCs primed with fungi *ex vivo* promote antifungal immunity in naive mice [15-17]. Similarly, DCs transfected with fungal RNA *ex vivo* express fungal proteins on their surface and promote the development of protective T cell responses [15]. The interaction of human DCs with *P. insidiosum* and its consequences in the immune defense against this pathogen have not been studied previously. In this study, we investigated the *in vitro* ability of DCs pulsed with three different *P. insidiosum* antigens in primed lymphocytes response through profile analysis of cytokines released after pulsed DCs contact with lymphocytes.

## **Materials and Methods**

### *Microorganism and culture conditions*

A Brazilian *P. insidiosum* equine isolate was used in this study. The clinical strain Pi-290 was isolated in the Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) and was previously genotyped and registered with GenBank access number KJ176713 [18]. The strain was grown on corn meal agar (CMA, Himedia<sup>®</sup>) at 37°C for 48 h before experiments. Zoosporogenesis was induced as described [19]. Zoospores were counted using a Neubauer chamber.

### *Ethics and sampling*

The research protocols were approved by the Ethics Committee of Universidade Federal de Santa Maria and the participants signed informed consent forms. All the blood venous specimens were collected from a healthy voluntary donor using EDTA Vacutainer tubes (BD Diagnostics, Plymouth, UK).

### *Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolation*

PBMCs were isolated from whole peripheral blood by density gradient centrifugation using Histopaque-1077 (Sigma–Aldrich, St Louis, USA). Briefly, after centrifugation, the cell pellet was washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 and resuspended in the RPMI 1460 medium (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Vitrocell, Campinas, Brazil) and 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin Complete Growth Medium (CGM).

#### *Generation of human monocyte-derived dendritic cells (DCs)*

DCs were prepared as previously described [20]. Monocytes were isolated by the plastic adhesion method, where PBMCs were plated in 24-well culture plates at a cell density of  $10^7$  cells/mL and incubated for 2 h at 37 °C in a 5% humidified CO<sub>2</sub> atmosphere. After monocyte adhesion, cells were washed three times with PBS to avoid lymphocyte contamination. DCs were generated by culturing monocytes with CGM supplemented with 50 ng/mL human recombinant Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, Sigma–Aldrich, St Louis, USA) and 50 ng/mL of human recombinant IL-4 (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) for 10 days and the medium was refreshed at days 3 and 6. DC generation was evaluated by inverted microscopy, and at day 10, the cells presented the typical morphology of immature DCs. The survival rate was evaluated by the trypan blue dye exclusion method to perform *in vitro* experiments.

#### *Antigen preparation*

Three different antigens were used in this study to assess DCs' *in vitro* potential to stimulate lymphocyte proliferation and cytokine production. The immunotherapeutic PitiumVac<sup>®</sup> was produced by Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) at the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) and it is composed of inactivated and

macerated hyphae [19]. *P. insidiosum* cell wall  $\beta$ -glucans were extracted as described by Tondolo et al. (2016) (submitted manuscript). The heat-inactivated (HI) zoospores consisted of *P. insidiosum* zoospores prepared as described above and inactivated by heating at 120 °C in an autoclave for 5 minutes. All antigens were diluted in CGM.

#### *DC pulsing and lymphocyte co-culture*

Immature DCs were washed with RPMI 1460 medium before being resuspended in CGM and plated in 96-well microplates at  $10^6$  cells/mL to be primed with the antigen solutions. PitiumVac<sup>®</sup> and the final concentration of  $\beta$ -glucans were both diluted in CGM and were adjusted to 100  $\mu$ g/mL and 400  $\mu$ g/mL based on previous observations (data not shown). The concentration of HI-zoospores was adjusted to  $2 \times 10^4$  and  $5 \times 10^4$  in CGM. In addition, a control group was primed with 1  $\mu$ g/mL LPS (Sigma–Aldrich, St Louis, USA), representing a positive control. After treatments, DCs were incubated for 2 hours at 37 °C in a 5% humidified CO<sub>2</sub> atmosphere to allow antigen internalization by cells [15]. To assess the tendency of the antigens to induce a T helper response by lymphocytes, PBMCs prepared as above were counted by the trypan blue dye exclusion method and co-cultured at  $10^6$  cells/mL with different pulsed DCs groups (at 1:1 ratio) for 24 hours. After that, the plates were centrifuged at 1500 rpm for 5 min and the supernatant was collected and stored at -80 °C until cytokine analysis.

#### *Cytokine detection*

The levels of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-17A were detected using a Cytometric Bead Array (CBA) human Th1/Th2/Th17 cytokine kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Samples were analyzed on a flow cytometry device BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, USA).

### *Cell proliferation*

The proliferative rate of lymphocytes stimulated with pulsed DCs was measured after 72 h of incubation at 37 °C in a 5% humidified CO<sub>2</sub> atmosphere using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay [21]. Briefly, 4 h before the end of incubation, 20 µL of MTT (5 mg/mL) was added to each well. The plates were centrifuged at 1500 rpm for 5 min at room temperature. The supernatant was carefully removed and 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) were added into each well. The absorbance was measured at 590 nm in a plate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The cell proliferation observed in each treatment was expressed as the mean of the group optical density.

### *Statistical analysis*

Data are expressed as the mean ± S.D. One-way ANOVA followed by Holm-Sydk post-hoc test was performed on SigmaPlot 12.5 to analyze cytokine data. To analyze lymphocyte proliferation data, one-way ANOVA was followed by Dunnett's post-hoc test. Significant differences were considered at  $P < 0.05$ . All tests were performed in 5 replicates in two independent experiments.

## **Results**

Lymphocyte proliferation induced by DCs primed with β-glucans, PitiumVac<sup>®</sup> and HI-zoospores

The ability of *P. insidiosum* primed DCs to induce human lymphocyte proliferation was observed (Figure 1). The immunotherapeutic PitiumVac<sup>®</sup> (P) showed a significant induction on lymphocyte proliferation in both concentrations of 100 µg/mL (P100) and 400

$\mu\text{g/mL}$  (P400) when compared to the untreated group. On the other hand,  $\beta$ -glucans (G) and *P. insidiosum* HI-zoospore (Z) did not present significant proliferative activity when compared to the control group in any concentration (G100/400, Z20000 and Z50000).

*P. insidiosum*  $\beta$ -glucans primed DCs induced an increase on IL-6 and IFN- $\gamma$  levels in human lymphocytes

We analyzed the potential of  $\beta$ -glucans extracted from *P. insidiosum* cell wall to activate a human immune response *in vitro* (Figure 2). The IL-2 level significantly decreased. On the other hand, IL-6, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels significantly increased compared with the control group. Similarly, the anti-inflammatory cytokine IL-10 showed a significant increase in relation to the RPMI control group. No differences were observed between DCs primed with G100 and G400. IL-4 and IL-17A did not present a significant difference in any treatment.

PitiumVac<sup>®</sup> primed DCs induced the Th1 cytokine pattern with IL-2, IL-6 and IFN- $\gamma$  production

Lymphocytes cultured with the immunotherapeutic PitiumVac<sup>®</sup>-primed DCs showed an increase in IL-2 production on P400, while IL-6, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels were increased in both concentrations when compared to the control group (Figure 2). We also observed a significant difference in the levels of IL-6 production between P100 and P400, with a higher response on the major concentration. In the same manner that observed in  $\beta$ -glucans, IL-10 levels also showed a significant increase. On the other hand, even without a significant difference compared to the control group, a significant difference was observed among the two concentrations of PitiumVac<sup>®</sup> on IL-4 level, which was increased at P400 of the immunotherapy when compared to P100.

HI-zoospores of *P. insidiosum* induced a strong Th1 cytokine response in human lymphocytes

Both Z20000- and Z50000-primed DCs induced the most expressive Th1 cytokine production by human lymphocytes in this study. The observed levels of the cytokines INF- $\gamma$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the Z50000 group were higher than those of the RPMI,  $\beta$ -glucans and PitiumVac<sup>®</sup> groups and, in the Z20000 group, the same was observed for INF- $\gamma$  and IL-6, and the TNF- $\alpha$  level was significantly different relative to the RPMI group. An increase in the production of IL-10 was also observed, opposing this tendency. No differences were observed in the IL-2 level, such as IL-4 and IL-17A levels (Figure 2).

## Discussion

Because lymphocyte proliferation is a direct indicator of cellular immunity, we analyzed the role of *P. insidiosum* antigens on immunological stimulation. Dendritic cells pulsed with the immunotherapeutic PitiumVac<sup>®</sup> induced lymphocyte proliferation in the two concentrations tested. Other studies showed that  $\beta$ -glucans are potent immune system modulators by increasing lymphocyte proliferation and DC activation, inducing cytokine production [22, 23]. Interestingly, the HI-zoospore and  $\beta$ -glucans pulsed DCs did not show a significant difference compared to the RPMI control group. We also observed that among the antigens tested, PitiumVac<sup>®</sup> was the only one that induced a significant increase in IL-2 levels. It is known that this cytokine major function is to induce the proliferation of T lymphocytes [24].

Among the antigens tested, *P. insidiosum* HI-zoospores presented the strongest induction to the Th1 response, with a great increase in the levels of the cytokines IL-6, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . These findings suggest a potential use of the HI-zoospore-primed DCs as a vaccine against pythiosis, since the postulated mechanism of cure for this disease related to

immunotherapy is based on the switch from a Th2 to a Th1 response. We also observed the production of significant levels of IL-10 in the lymphocytes treated with the HI-zoospore-primed DCs even though this treatment also presented a major induction of Th1 cytokines. Similar results were also observed by Bacci et al. (2002) in a study with DCs pulsed with *Candida albicans* yeasts or yeast RNA. They observed that significant levels of IL-10 coexisted with a protective Th1 response [15]. It is known that in terms of interference with the development and activity of the antifungal Th1 response, the effect of IL-10 is dependent upon the dose of the cytokine [25]. In the same time that IL-10 can create favorable conditions for the persistence of pathogens and chronic infectious diseases, it also attenuates exaggerated immune responses that can lead to tissue damage; therefore, it may represent a therapeutic objective [14, 26].

As shown by Bozza et al. (2003), human DCs present plasticity in response to fungus, as a different response was found among *Aspergillus fumigatus* conidia and hyphae-primed DCs [27]. Many studies demonstrated that DCs primed with fungal conidia or conidia RNA present Th1 reactivity, while DCs primed with fungal hyphae or hyphae RNA present Th2 reactivity [15, 27, 28]. In our study, we found a strong induction of the Th1 response by *P. insidiosum* zoospores, with high levels of IFN- $\gamma$  and IL-6 when compared to the other groups and the LPS positive control.

The equine immunotherapeutic product PitiumVac<sup>®</sup> also induced a Th1 subset of cytokines, with an increase of IL-6 and IFN- $\gamma$  levels. IL-2 production also increased in the P400 group. These results could be expected since PitiumVac<sup>®</sup> efficacy has already been demonstrated and is used to treat Brazilian equine pythiosis and a case of pythiosis in a dog [19, 29], but there are no reports of the use of this preparation on humans or in a human cell model. Similarly, *P. insidiosum*  $\beta$ -glucans presented an increase in IL-6 and TNF- $\alpha$  levels and a small but significant increase in IFN- $\gamma$  level. In the other hand, in contrast to PitiumVac<sup>®</sup>,  $\beta$ -

glucans showed a significant decrease in IL-2 level. These results are similar to those described by Martirosyan et al. (2012) who described DC activation with the release of IL-6, IL-12 and TNF- $\alpha$  by *Brucella*  $\beta$  1,2 cyclic glucan [22]. Another study with macrophages co-cultured with lymphocytes showed that  $\beta$ -glucans decreased IL-2 level and increased IL-4 and IL-10 levels [23].

It was recently shown that dendritic cell-based immunization had protective effects in mice experimental pulmonary infection caused by highly virulent *Cryptococcus gattii* via the activation of IL-12p40 and TNF- $\alpha$  production and via the development of leucocytes and macrophages into multinucleated giant cells, that engulfed the fungal cells in the lungs of mice immunized with the DC-based vaccine [16, 30]. Other studies showed a positive therapeutic response against aspergillosis in a hematopoietic transplantation model in mice vaccinated with DCs pulsed with *Aspergillus fumigatus* conidia [27], immunization against *Pseudomonas aeruginosa* [31], *Paracoccidioides brasiliensis* [17] and *Candida albicans* [15, 28] via the activation of a Th1 subset of cytokines.

At the present moment, immunotherapy is the most successful method used to treat equine pythiosis, and in human infections, it is used as a last resource when patients do not respond to any drug therapy, and when surgical removal of the affected area is not effective or is not possible [5, 32]. The infection starts when a propagule zoospore of the oomycete comes in contact with the host and forms a germ tube that penetrates the host's damaged tissue. Then, the *Pythium insidiosum* hyphae release exoantigens, which are recognized by the antigen-presenting cells (APC), which release IL-4 and drives the Th2 response [33, 34]. The proposed mechanism to explain the success of immunotherapy is based on the switch of the Th2 response, characterized by the release of IL-4 and IL-5 and the mobilization of eosinophils and mast cells to a mononuclear Th1 response, with the release of IL-2 and INF- $\gamma$  and the mobilization of T lymphocytes and macrophages, which destroy *P. insidiosum* cells



[35]. The data to postulate this hypothesis were obtained from horses and humans. Our findings provide important information for the development of new strategies of treatment or the acquisition of immunity against pythiosis since there are no available prophylactic vaccines for humans and horses nor an efficient treatment approach for human pythiosis.

In conclusion, our results suggest a potential use of DCs pulsed with the three antigens tested,  $\beta$ -glucans, PitiumVac<sup>®</sup> and HI-zoospore, as a therapeutic vaccine against pythiosis, as it promotes the activation of the Th1 subset of cytokines, which are essential for the recovery of the disease. HI-zoospores presented the strongest Th1 response when compared to the other antigens, particularly with significant induction of IL-6 and IFN- $\gamma$ . *In vivo* studies are necessary to confirm these results, and the potential use of DCs pulsed with *P. insidiosum* zoospores in the control of pythiosis.

### **Conflict of Interest Statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

### **Acknowledgements**

This study was supported by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), Brazil. We thank the Brazilian agency *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for their support. ESL is the recipient of a PNPd-CAPES fellowship.

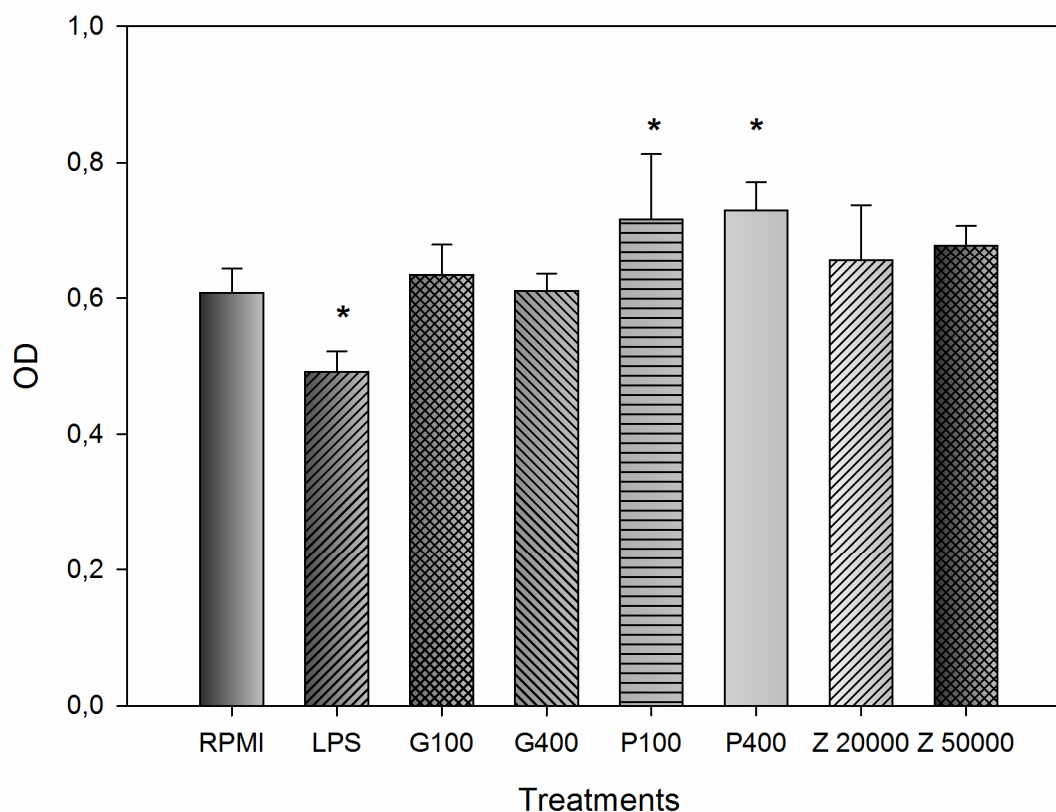
## References

- [1] Beakes GW, Glockling SL, Sekimoto S. The evolutionary phylogeny of the oomycete "fungi". *Protoplasma*. 2012;249:3-19.
- [2] Gaastra W, Lipman LJ, De Cock AW, Exel TK, Pegge RB, Scheurwater J, et al. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet Microbiol*. 2010;146:1-16.
- [3] Thitithanyanont A, Mendoza L, Chuansumrit A, Prachartam R, Laothamatas J, Sathapatayavongs B, et al. Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. *Clin Infect Dis*. 1998;27:1394-400.
- [4] Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis*. 2006;43:569-76.
- [5] Wanachiwanawin W, Mendoza L, Visuthisakchai S, Mutsikapan P, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A, et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. *Vaccine*. 2004;22:3613-21.
- [6] Sudjaritruk T, Sirisanthana V. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. *BMC Infect Dis*. 2011;11:33.
- [7] Mendoza L, Newton JC. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Med Mycol*. 2005;43:477-86.
- [8] Santos CE, Marques LC, Zanette RA, Jesus FP, Santurio JM. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18:1397-9.
- [9] Walsh KP, Mills KH. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol*. 2013;34:521-30.

- [10] Roy RM, Klein BS. Dendritic cells in antifungal immunity and vaccine design. *Cell Host Microbe*. 2012;11:436-46.
- [11] Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:1-22.
- [12] Bozza S, Montagnoli C, Gaziano R, Rossi G, Nkwanyuo G, Bellocchio S, et al. Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. *Vaccine*. 2004;22:857-64.
- [13] Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:275-88.
- [14] Romani L, Puccetti P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol*. 2006;14:183-9.
- [15] Bacci A, Montagnoli C, Perruccio K, Bozza S, Gaziano R, Pitzurra L, et al. Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. *J Immunol*. 2002;168:2904-13.
- [16] Ueno K, Kinjo Y, Okubo Y, Aki K, Urai M, Kaneko Y, et al. Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent *Cryptococcus gattii*. *Infect Immun*. 2015;83:1577-86.
- [17] Magalhaes A, Ferreira KS, Almeida SR, Nosanchuk JD, Travassos LR, Taborda CP. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19:23-9.
- [18] Jesus FP, Loreto ES, Ferreira L, Alves SH, Driemeier D, Souza SO, et al. In vitro and in vivo antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin or tigecycline against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;60:87-91.
- [19] Santurio JM, Leal AT, Leal AB, Festugatto R, Lubeck I, Sallis ES, et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosum developed and evaluated. *Vaccine*. 2003;21:2535-40.

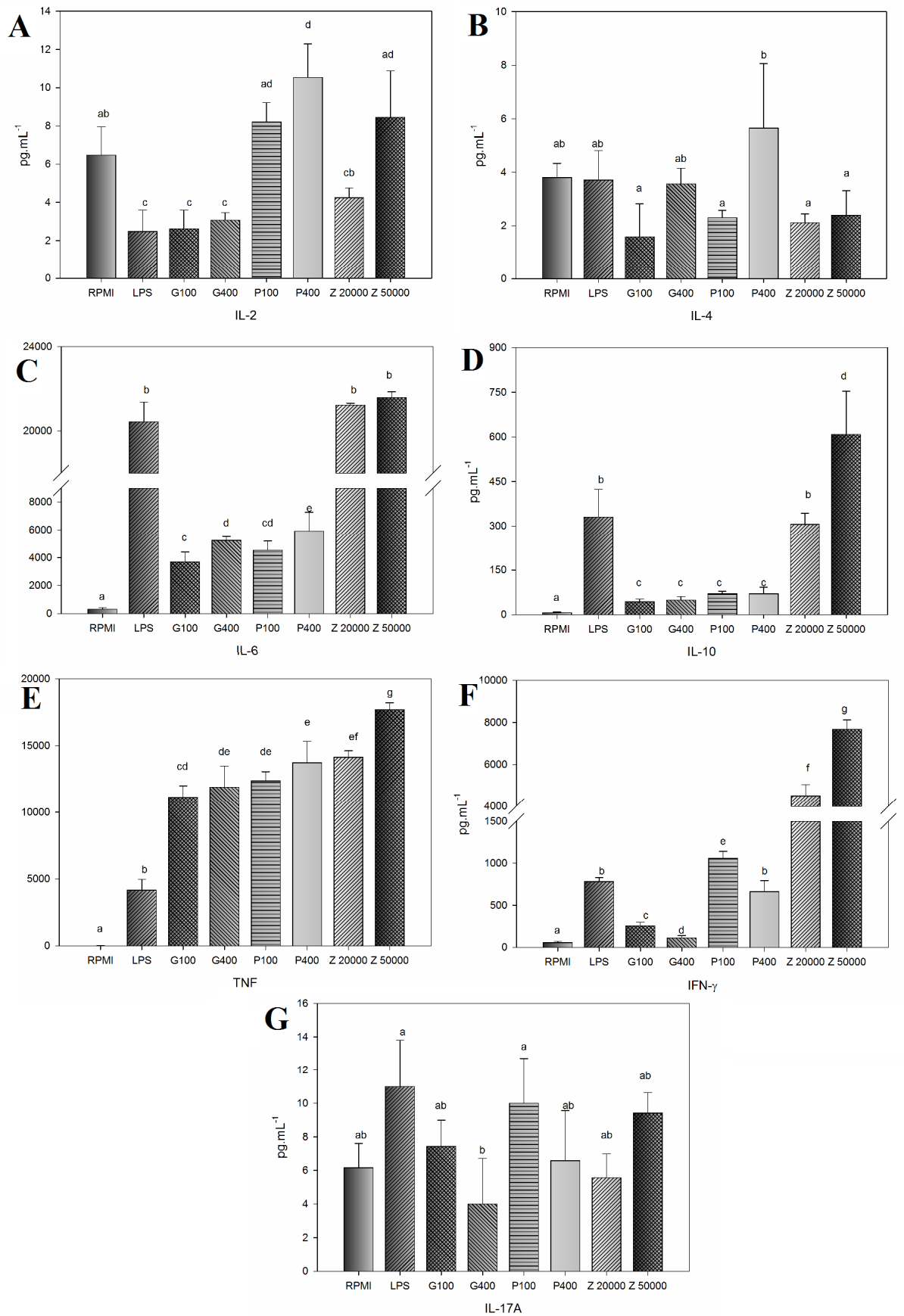
- [20] Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol*. 1997;27:431-41.
- [21] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
- [22] Martirosyan A, Perez-Gutierrez C, Banchereau R, Dutartre H, Lecine P, Dullaers M, et al. *Brucella* beta 1,2 cyclic glucan is an activator of human and mouse dendritic cells. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002983.
- [23] Chen Y, Dong L, Weng D, Liu F, Song L, Li C, et al. 1,3-beta-glucan affects the balance of Th1/Th2 cytokines by promoting secretion of anti-inflammatory cytokines in vitro. *Mol Med Report*. 2013;8:708-12.
- [24] Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*. 2004;28:109-23.
- [25] Travassos LR, Rodrigues EG, Iwai LK, Taborda CP. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. *Mycopathologia*. 2008;165:341-52.
- [26] Mege JL, Meghari S, Honstetter A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis*. 2006;6:557-69.
- [27] Bozza S, Perruccio K, Montagnoli C, Gaziano R, Bellocchio S, Burchielli E, et al. A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation. *Blood*. 2003;102:3807-14.
- [28] d'Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, et al. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med*. 2000;191:1661-74.

- [29] Pereira DI, Botton SA, Azevedo MI, Motta MA, Lobo RR, Soares MP, et al. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. *Mycopathologia*. 2013;176:309-15.
- [30] Chaturvedi AK, Hameed RS, Wozniak KL, Hole CR, Leopold Wager CM, Weintraub ST, et al. Vaccine-mediated immune responses to experimental pulmonary *Cryptococcus gattii* infection in mice. *PLoS One*. 2014;9:e104316.
- [31] Peluso L, de Luca C, Bozza S, Leonardi A, Giovannini G, Lavorgna A, et al. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice by recombinant OprF-pulsed dendritic cell immunization. *BMC Microbiol*. 2010;10:1-11.
- [32] Pan JH, Kerkar SP, Siegenthaler MP, Hughes M, Pandalai PK. A complicated case of vascular *Pythium insidiosum* infection treated with limb-sparing surgery. *Int J Surg Case Rep*. 2014;5:677-80.
- [33] Shipton WA. *Pythium destruens* sp. nov., an agent of equine pythiosis. *J Med Vet Mycol*. 1987;25:137-51.
- [34] Miller RI. Gastrointestinal phycomycosis in 63 dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1985;186:473-8.
- [35] Mendoza L, Mandy W, Glass R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. *Vaccine*. 2003;21:2797-804.

**Figure 1**

**Figure 1:** Cell proliferation of naïve T cells co-cultured with DCs pulsed with  $\beta$ -glucan (G100 or G400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), PitiumVac<sup>®</sup> (P100 or P400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or heat-inactivated zoospores (Z  $2 \times 10^4$  or Z  $5 \times 10^4$  cells/mL) besides a positive LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and a negative RPMI control group. Fresh human lymphocytes were cultured with pulsed DCs for 72 h to assess the *P. insidiosum* tested antigens ability to induce lymphocyte proliferation using the MTT colorimetric assay. Data are representative of a single experiment of two independent experiments performed in five replicates for each group. \* $P < 0.001$  compared with RPMI control group determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's test. Data are shown as mean  $\pm$  S.D.

Figure 2



**Figure 2:** Determination of the concentrations of representative Th1-, Th2- and Th17-type cytokines. Cytokine production by fresh human lymphocyte upon exposure to DC-primed with  $\beta$ -glucan (G100 or G400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), PitiumVac<sup>®</sup> (P100 or P400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and heat-inactivated zoospores (Z  $2 \times 10^4$  or Z  $5 \times 10^4$  cells/mL) besides LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) positive control and RPMI negative control. DCs were pulsed for 2 h with the antigens tested before co-culture with naïve T cells for 24 h. The levels of the cytokines (A) IL-2, (B) IL-4, (C) IL-6, (D) IL-10, (E) TNF- $\alpha$ , (F) IFN- $\gamma$  and (G) IL-17A were detected (pg/mL) in stimulated culture supernatants *in vitro* using a Cytometric Bead Array (CBA) human Th1/Th2/Th17 cytokine kit. Data are representative of a single experiment of two independent experiments performed in five replicates for each group. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA followed by Holm-Sydk post-hoc test was performed and statistic difference was considered at  $P < 0.05$  (different letters represent statistically significant difference).



#### 4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- Os antígenos testados,  $\beta$ -glucanas, PitiumVac<sup>®</sup> e zoósporos inativados por calor, eficientemente ativaram as células dendríticas, modulando a produção de citocinas dos linfócitos T humanos;
- As DCs pulsadas com PitiumVac<sup>®</sup> induzem a proliferação de linfócitos, enquanto as  $\beta$ -glucanas e zoósporos inativados não causam indução significativa na atividade proliferativa;
- As DCs pulsadas com as  $\beta$ -glucanas, PitiumVac<sup>®</sup> e zoósporos inativados por calor, induzem uma resposta Th1 em linfócitos, com a produção principalmente de IL-6 e IFN- $\gamma$ , sugerindo potencial na imunização e cura da pitiose. Entretanto, mais estudos incluindo estudos *in vivo* devem ser realizados para confirmar estes resultados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, S.; O'NEILL, D. W.; BHARDWAJ, N. Recent advances in dendritic cell biology. **Journal of Clinical Immunology**, v. 25, p. 87-98, 2005.
- ADHIKARI, B. N. et al. Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes. **PloS One**, v. 8, p. e75072, 2013.
- AGALLOU, M.; MARGARONI, M.; KARAGOUNI, E. Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of *Leishmania infantum* KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 29, p. 5053-5064, 2011.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Phylum Oomycota. In: (Ed.). **Introductory Mycology**. 4. New York: John Wiley & Sons, 1996. cap. 23, p.683-737.
- ALFARO, A. A.; MENDOZA, L. Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium insidiosum*. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, p. 295-297, 1990.
- ÁLVAREZ, J. C.; GARCÍA, L. R.; GARAY, O. V. Pythiosis cutánea equina en Córdoba, Colombia: Reporte de 5 casos. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v. 20, p. 590-594, 2010.
- ANGUILLE, S. et al. Dendritic Cells as Pharmacological Tools for Cancer Immunotherapy. **Pharmacological Reviews**, v. 67, p. 731-753, 2015.
- AUSTWICK, P. K.; COPLAND, J. W. Swamp cancer. **Nature**, v. 250, p. 84, 1974.
- BACCI, A. et al. Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 2904-2913, 2002.
- BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 767-811, 2000.
- BERNARDO, F. D. et al. Pythiosis in sheep from Paraná, southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 513-517, 2015.
- BOONSTRA, A. et al. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: Dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, p. 101-109, 2003.
- BOSCO, S. M. G. Human pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 715-717, 2005.
- BOZZA, S. et al. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 1362-1371, 2002.

BOZZA, S. et al. Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. **Vaccine**, v. 22, p. 857-864, 2004.

BOZZA, S. et al. A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation. **Blood**, v. 102, p. 3807, 2003.

BROWN, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nature Reviews: Immunology**, v. 6, p. 33-46, 2006.

BUDHU, S. et al. CD8+ T cell concentration determines their efficiency in killing cognate antigen-expressing syngeneic mammalian cells in vitro and in mouse tissues. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, p. 223-235, 2010.

BURGDORF, S. K. et al. Clinical responses in patients with advanced colorectal cancer to a dendritic cell based vaccine. **Oncology Reports**, v. 20, p. 1305-1311, 2008.

CALVANO, T. P. et al. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 3710-3713, 2011.

CAMUS, A. C.; GROOTERS, A. M.; AQUILAR, R. F. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 567-571, 2004.

CAUX, C. et al. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 22, p. 345-369, 2000.

CAVALHEIRO, A. S. et al. In Vitro activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 2136-2138, 2009a.

CAVALHEIRO, A. S. et al. In vitro activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 408-411, 2009b.

CELLUZZI, C. M.; FALO, L. D. Cutting edge: Physical interaction between dendritic cells and tumor cells results in an immunogen that induces protective and therapeutic tumor rejection. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 3081-3085, 1998.

CHAFFIN, M. K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W. C. Cutaneous pythiosis in the horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 11, p. 91-103, 1995.

CHAN, C. W. et al. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. **Nature Medicine**, v. 12, p. 207-213, 2006.

CHENG, P. Y. et al. Notch signaling is necessary but not sufficient for differentiation of dendritic cells. **Blood**, v. 102, p. 3980-3988, 2003.

CLAUDIA, M. et al. The interaction of fungi with dendritic cells: implications for Th immunity and vaccination. **Current Molecular Medicine**, v. 2, p. 507-524, 2002.

- COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**, v. 33, p. 492-503, 2010.
- CONSTANTINO, J. et al. Antitumor dendritic cell-based vaccines: lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. **Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 168, p. 74-95, 2016.
- D'OSTIANI, C. F. et al. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*: Implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, p. 1661-1673, 2000.
- DE COCK, A. W. et al. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 344-349, 1987.
- DE HAAN, J.; HOOGKAMER, L. J. Hypho-mycosis destruens. **Veeartsennijkundige Bladen voor Nederlandsch-Indie**, v. 13, p. 350-374, 1901.
- DEMANGEL, C. et al. Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin-infected dendritic cells. **European Journal of Immunology**, v. 29, p. 1972-1979, 1999.
- DI CARLO, F. J.; FIORE, J. V. On the composition of zymosan. **Science**, v. 127, p. 756-757, 1958.
- DILLON, S. et al. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 916-928, 2006.
- DYKSTRA, M. J. et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Medical Mycology**, v. 37, p. 427-433, 1999.
- FAJARDO-MOSER, M.; BERZEL, S.; MOLL, H. Mechanisms of dendritic cell-based vaccination against infection. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, p. 11-20, 2008.
- FALCON, C. R. et al. Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Fasciola hepatica* antigens and lipopolysaccharides confers protection against fasciolosis in mice. **The Journal of Infectious Diseases**, p. doi: 10.1093/infdis/jir1606, 2011.
- FIGDOR, C. G. et al. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. **Nature Medicine**, v. 10, p. 475-480, 2004.
- FISCHER, J. R. et al. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 380-382, 1994.
- FLOHE, S. B. et al. Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major*. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 3800-3811, 1998.
- FOIL, C. S. **Update on pythiosis (Oomycosis)**. Orlando: Bayer Animal Health, 1996. 57-63.

- GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**, v. 146, p. 1-16, 2010.
- GLENNY, A. T. The Principles of Immunity applied to Protective Inoculation against Diphtheria. **Journal of Hygiene**, v. 24, p. 301-320, 1925.
- GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**, v. 111, p. 927-930, 2002.
- GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice**, v. 33, p. 695-720, 2003.
- GUERMONPREZ, P. et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 621-667, 2002.
- HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P. R.; WEAVER, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 349-356, 2006.
- HEMMI, H. et al. The roles of toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 3059-3064, 2003.
- HENDRIX, J. W. Sterol Induction of Reproduction and Stimulation of Growth of *Pythium* and *Phytophthora*. **Science**, v. 144, p. 1028-1029, 1964.
- HENRIQUES, H. R. et al. Targeting the non-structural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers protective immunity to lethal virus challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. e2330, 2013.
- HENSEL, P. et al. Immunotherapy for treatment of multicentric cutaneous pythiosis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, p. 215-218, 197, 2003.
- HOWERTH, E. W.; BROWN, C. C.; CROWDER, C. Subcutaneous pythiosis in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, p. 81-83, 1989.
- HUANG, H. et al. Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal beta-glucans and toll-like receptor agonists. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 1774-1781, 2009.
- ICHTANI, T.; AMEMIYA. *Pythium gracile* isolated from the foci of granular dermatitis in the horse (*Equus caballus*). **Transactions of Mycology Society of Japan**, v. 21, p. 263-265, 1980.
- IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgraduate Medical Journal**, v. 70, p. 558-560, 1994.
- IMWIDTHAYA, P. Mycotic keratitis in Thailand. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 33, p. 81-82, 1995.

- INABA, K. et al. Dendritic cells pulsed with protein antigens *in vitro* can prime antigen-specific, MHC-restricted T-cells *in situ*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, p. 631-640, 1990.
- ITO, T. et al. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 1507-1512, 2002.
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. **Science**, v. 327, p. 291-295, 2010.
- JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197-216, 2002.
- JESUS, F. P. et al. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, p. e89-93, 2015a.
- JESUS, F. P. et al. *In vitro* synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline in association with antifungal agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 5621-5625, 2014.
- JESUS, F. P. et al. In vitro and in vivo antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin or tigecycline against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 87-91, 2015b.
- JIN, D. et al. Therapeutic vaccination against advanced pancreatic cancer by autologous dendritic cells pulsed with a MUC1 peptide: Preclinical results of a clinical phase I trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, 2009.
- KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor function and signaling. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, p. 979-987, 2006.
- KAUFMAN, L. Penicilliosis marneffeii and pythiosis: emerging tropical diseases. **Mycopathologia**, v. 143, p. 3-7, 1998.
- KEERATIJARUT, A. et al. A peptide ELISA to detect antibodies against *Pythium insidiosum* based on predicted antigenic determinants of exo-1,3-beta-glucanase. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 44, p. 672-680, 2013.
- KRAJAEJUN, T. et al. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked Immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 378-382, 2002.
- KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 569-576, 2006.
- KUWABARA, K. et al. Results of a phase I clinical study using dendritic cell vaccinations for thyroid cancer. **Thyroid**, v. 17, p. 53-58, 2007.

LAMOUR, K.; KAMOUN, S. *Pythium insidiosum* and mammalian hosts. In: (Ed.). **Oomycete Genetics and Genomics : Diversity, Interactions and Research Tools**. 1 ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, 2009. cap. 19, p.387-405.

LAOHAPENSANG, K. et al. Vascular pythiosis in a thalassemic patient. **Vascular**, v. 17, p. 234-238, 2009.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. et al. Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming of cytotoxic T-cell responses. **Blood**, v. 112, p. 4971-4980, 2008.

LESTERHUIS, W. J. et al. Dendritic cell-based vaccines in cancer immunotherapy: an update on clinical and immunological results. **Annals of Oncology**, v. 15, p. 145-151, 2004.

LEVESQUE, C. A.; DE COCK, A. W. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycol Res**, v. 108, p. 1363-1383, 2004.

LI, B. et al. Orally administered particulate beta-glucan modulates tumor-capturing dendritic cells and improves antitumor T-cell responses in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 16, p. 5153-5164, 2010.

LI, B. et al. Murine dendritic cells modified with CXCL10 gene and tumour cell lysate mediate potent antitumour immune responses in mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 65, p. 8-13, 2007.

LIN, L. et al. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. **PLoS Pathogens**, v. 5, p. e1000703, 2009.

LOPEZ, C. B. et al. A mouse model for immunization with *ex vivo* virus-infected dendritic cells. **Cellular Immunology**, v. 206, p. 107-115, 2000.

LORETO, E. S. et al. New insights into the in vitro susceptibility of *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 7534-7537, 2014a.

LORETO, E. S. et al. Update on pythiosis immunobiology and immunotherapy. **World Journal of Immunology**, v. 4, p. 88-97, 2014b.

LU, H. et al. Dendritic cells (DCs) transfected with a recombinant adenovirus carrying chlamydial major outer membrane protein antigen elicit protective immune responses against genital tract challenge infection. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v. 88, p. 757-765, 2010.

LU, H.; ZHONG, G. M. Interleukin-12 production is required for chlamydial antigen-pulsed dendritic cells to induce protection against live *Chlamydia trachomatis* infection. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 1763-1769, 1999.

MAGALHAES, A. et al. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, p. 23-29, 2012.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.  $\beta$ -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. **Semin-Ciênc Agrar**, v. 19, p. 631-650, 2008.

MAHL, D. L. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigeicycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 4021-4023, 2012.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 865-868, 2012.

MARTINS, T. B. et al. A comparative study of the histopathology and immunohistochemistry of pythiosis in horses, dogs and cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, p. 122-131, 2012.

MAYORDOMO, J. I. et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumor peptides elicit protective and therapeutic antitumor immunity. **Nature Medicine**, v. 1, p. 1297-1302, 1995.

MBOW, M. L. et al. *Borrelia burgdorferi*-pulsed dendritic cells induce a protective immune response against tick-transmitted spirochetes. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 3386-3390, 1997.

MCGREAL, E. P.; MILLER, J. L.; GORDON, S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, p. 18-24, 2005.

MCINTOSH, M.; STONE, B. A.; STANISICH, V. A. Curdlan and other bacterial (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 163-173, 2005.

MCKENNA, K.; BEIGNON, A. S.; BHARDWAJ, N. Plasmacytoid dendritic cells: Linking innate and adaptive immunity. **Journal of Virology**, v. 79, p. 17-27, 2005.

MEIRELES, M. C. et al. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. **Mycoses**, v. 36, p. 139-142, 1993.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 6, p. 151-164, 1996.

MENDOZA, L.; ALFARO, A. A. Equine pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. **Mycopathologia**, v. 94, p. 123-129, 1986.

MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2967-2973, 1993.

MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, p. 715-718, 1997.



MENDOZA, L.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**, v. 21, p. 2797-2804, 2003.

MENDOZA, L.; MARIN, G. Antigenic relationship between *Pythium insidiosum* de Cock et al. 1987 and its synonym *Pythium destruens* Shipton 1987. **Mycoses**, v. 32, p. 73-77, 1989.

MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 43, p. 477-486, 2005.

MENDOZA, L.; PRASLA, S. H.; AJELLO, L. Orbital pythiosis: a non-fungal disease mimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. **Mycoses**, v. 47, p. 14-23, 2004.

MENDOZA, L.; VILELA, R. Anomalous fungal and fungal-like infections: lacaziosis, pythiosis, and rhinosporidiosis. In: ANAISSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R., *et al* (Ed.). **Clinical mycology**. 2nd. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2009. cap. 18, p.403-415.

MENDOZA, L.; VILELA, R. The mammalian pathogenic oomycetes. **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, p. 198-208, 2013.

MILLER, R. I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, p. 377-382, 1981.

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, p. 221-226, 1982.

MINARIK, I. et al. Phase I/II of clinical study of prostate cancer immunotherapy using dendritic cell vaccination strategy - First results. **European Urology Supplements**, v. 9, p. 629-629, 2010.

MOLL, H. Dendritic cells as a tool to combat infectious diseases. **Immunology Letters**, v. 85, p. 153-157, 2003.

MOLL, H. Antigen delivery by dendritic cells. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p. 337-344, 2004.

MOORE-LANDECKER, J. Zoospore fungi. In: (Ed.). **Fundamentals of the fungi**. 4. New Jersey: Prentice Hall, Inc, 1996. cap. 3, p.33-79.

MURPHY, K. M.; REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 933-944, 2002.

MURTHY, V. et al. Clinical considerations in developing dendritic cell vaccine based immunotherapy protocols in cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 9, p. 725-731, 2009.

NETEA, M. G. et al. From the Th1/Th2 paradigm towards a toll-like receptor/T-helper bias. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 3991-3996, 2005.

- NETO, R. T. et al. Cutaneous pythiosis in a dog from Brazil. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 202-204, 2010.
- PAN, J. H. et al. A complicated case of vascular *Pythium insidiosum* infection treated with limb-sparing surgery. **International Journal of Surgery Case Reports**, v. 5, p. 677-680, 2014.
- PELUSO, L. et al. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice by recombinant OprF-pulsed dendritic cell immunization. **Bmc Microbiology**, v. 10, p. 9, 2010.
- PENNOCK, N. D.; KEDL, J. D.; KEDL, R. M. T Cell Vaccinology: Beyond the Reflection of Infectious Responses. **Trends in Immunology**, 2016.
- PEREIRA, D. I. et al. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 176, p. 309-315, 2013.
- PEREIRA, D. I. et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1168-1171, 2007.
- PEREZ, R. C. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p. 121-128, 2005.
- PESAVENTO, P. A. et al. Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 538-541, 2008.
- PESSOA, C. R. et al. Pythiosis of the digestive tract in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, p. 1133-1136, 2012.
- PIRES, L. et al. Photodynamic therapy in *Pythium insidiosum* - an *in vitro* study of the correlation of sensitizer localization and cell death. **PloS One**, v. 9, p. e85431, 2014.
- POOLE, H. M.; BRASHIER, M. K. Equine cutaneous pythiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 25, p. 229-235, 2003.
- PRASERTWITAYAKIJ, N. et al. Human pythiosis, a rare cause of arteritis: case report and literature review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 33, p. 204-214, 2003.
- PULENDRAN, B.; PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Sensing pathogens and tuning immune responses. **Science**, v. 293, p. 253-256, 2001.
- QI, C. et al. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived beta-glucans. **Blood**, v. 117, p. 6825-6836, 2011.
- RAVISHANKAR, J. P. et al. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 34, p. 167-175, 2001.

- REIS E SOUSA, C.; SHER, A.; KAYE, P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 11, p. 392-399, 1999.
- REMER, K. A. et al. Vaccination with plasmacytoid dendritic cells induces protection against infection with *Leishmania major* in mice. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 2463-2473, 2007.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 11-23, 2004.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews: Immunology**, v. 11, p. 275-288, 2011.
- ROMANI, L. et al. Thymosin alpha1 activates dendritic cell tryptophan catabolism and establishes a regulatory environment for balance of inflammation and tolerance. **Blood**, v. 108, p. 2265-2274, 2006.
- ROMANI, L.; PUC CETTI, P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 183-189, 2006.
- ROY, R. M.; KLEIN, B. S. Dendritic cells in antifungal immunity and vaccine design. **Cell host & microbe**, v. 11, p. 436-446, 2012.
- SABATTE, J. et al. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 18, p. 5-17, 2007.
- SANTOS, C. E. et al. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p. 1397-1399, 2011.
- SANTOS, C. E. et al. Epidemiological Survey of Equine Pythiosis in the Brazilian Pantanal and Nearby Areas: Results of 76 Cases. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 270-274, 2014.
- SANTURIO, J. M. et al. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 1-14, 2006a.
- SANTURIO, J. M. et al. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Veterinary Record**, v. 163, p. 276-277, 2008.
- SANTURIO, J. M.; FERREIRO, L. **Pitiose: uma abordagem micológica e terapêutica**. 1 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2008. 111p. ISBN 978-85-7025-939-4.
- SANTURIO, J. M. et al. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 47-50, 2006b.
- SANTURIO, J. M. et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosus developed and evaluated. **Vaccine**, v. 21, p. 2535-2540, 2003.

- SANTURIO, J. M. et al. Cutaneous Pythiosis insidiosus in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**, v. 141, p. 123-125, 1998.
- SCHLOEMER, N. J.; LINCOLN, A. H.; MIKHAILOV, T. A. Fatal disseminated *Pythium insidiosum* infection in a child with diamond-blackfan anemia. **Infectious Diseases in Clinical Practice (Baltimore, Md.)**, v. 21, p. e24-e26, 2013.
- SCHMIDT, C. S. et al. NDV-3, a recombinant alum-adjuvanted vaccine for *Candida* and *Staphylococcus aureus*, is safe and immunogenic in healthy adults. **Vaccine**, v. 30, p. 7594-7600, 2012.
- SCHON, E. et al. Dendritic cell vaccination protects mice against lethality caused by genital herpes simplex virus type 2 infection. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, p. 87-104, 2001.
- SCHURKO, A. et al. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. **Mycologia**, v. 95, p. 200-208, 2003.
- SHENEP, J. L. et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 1388-1393, 1998.
- SHIPTON, W. A. *Pythium destruens* sp. nov., an agent of equine pythiosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, p. 137-151, 1987.
- SHORTMAN, K.; NAIK, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 19-30, 2007.
- SMITH, F. The pathology of bursattee. **Veterinary Journal**, v. 19, p. 16-17, 1884.
- STEINMAN, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 1-22, 2012.
- STEINMAN, R. M.; ADAMS, J. C.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice .4. Identification and distribution in mouse spleen. **Journal of Experimental Medicine**, v. 141, p. 804-820, 1975.
- STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 137, p. 1142-1162, 1973.
- STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice .2. Functional properties *in vitro*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 139, p. 380-397, 1974.
- STEINMAN, R. M.; HEMMI, H. Dendritic cells: Translating innate to adaptive immunity. **From Innate Immunity to Immunological Memory**, v. 311, p. 17-58, 2006.
- STEINMAN, R. M. et al. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice .5. Purification of spleen dendritic cells, new surface markets, and maintenance *in vitro*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 149, p. 1-16, 1979.

- STEINMAN, R. M.; LUSTIG, D. S.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice .3. Functional properties *in vivo*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 139, p. 1431-1445, 1974.
- STOCKINGER, B.; VELDHOEN, M. Differentiation and function of Th17 T cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, p. 281-286, 2007.
- SUDJARITRUK, T.; SIRISANTHANA, V. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, p. 33, 2011.
- SUPABANDHU, J. et al. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**, v. 46, p. 41-52, 2008.
- TABOSA, I. M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in Northeastern Brazil. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 412-415, 2004.
- TAIEB, J. et al. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. **Nature Medicine**, v. 12, p. 214-219, 2006.
- TAKEDA, A. et al. Immature dendritic cell/tumor cell fusions induce potent antitumour immunity. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, p. 897-904, 2003.
- THIANPRASIT, M.; CHAIPRASERT, A.; IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis. **Current Topics in Medical Mycology**, v. 7, p. 43-54, 1996.
- THITITHANYANONT, A. et al. Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 1394-1400, 1998.
- THOMAS, R. C.; LEWIS, D. T. Pythiosis in dogs and cats. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, p. 63-75, 1998.
- THOMPSON, I. J.; OYSTON, P. C.; WILLIAMSON, D. E. Potential of the beta-glucans to enhance innate resistance to biological agents. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, p. 339-352, 2010.
- TOH, H. C. et al. Clinical benefit of allogeneic melanoma cell lysate-pulsed autologous dendritic cell vaccine in MAGE-positive colorectal cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 15, p. 7726-7736, 2009.
- UBIALI, D. G. et al. Pathology of nasal infection caused by *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 149, p. 137-145, 2013.
- UENO, K. et al. Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent *Cryptococcus gattii*. **Infection and Immunity**, v. 83, p. 1577-1586, 2015.
- VELDHOEN, M. et al. TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, p. 179-189, 2006.

WALSH, K. P.; MILLS, K. H. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. **Trends in Immunology**, v. 34, p. 521-530, 2013.

WANACHIWANAWIN, W. et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. **Vaccine**, v. 22, p. 3613-3621, 2004.

WHITE, S. D. et al. Cutaneous pythiosis in a nontravelled California horse. **Veterinary Dermatology**, v. 19, p. 391-394, 2008.

WUTHRICH, M. et al. Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 554-568, 2011.

YANG, Z.; MARSHALL, J. S. Zymosan treatment of mouse mast cells enhances dectin-1 expression and induces dectin-1-dependent reactive oxygen species (ROS) generation. **Immunobiology**, v. 214, p. 321-330, 2009.

YU, H.; BABIUK, L. A.; LITTEL-VAN DEN HURK, S. V. Immunity and protection by adoptive transfer of dendritic cells transfected with hepatitis CNS3/4A mRNA. **Vaccine**, v. 25, p. 1701-1711, 2007.