

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Eliza Mathias Melo

**SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA DOS EPÍTOPOS DA
PROTEÍNA RECOMBINANTE PB27 NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte

2017

Eliza Mathias Melo

**SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA DOS EPÍTOPOS DA
PROTEÍNA RECOMBINANTE Pb27 NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Imunologia e Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

Belo Horizonte

2017

043

Melo, Eliza Mathias.

Seleção e avaliação da atividade protetora de epítomos da proteína recombinante Pb27 na paracoccidiodomicose experimental [manuscrito] / Eliza Mathias Melo. – 2017.

93 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dawidson Assis Gomes. Coorientador: Prof. Alfredo Miranda Goes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Paracoccidídeos. 3. Epítomos. 4. Proteínas Recombinantes. 5. Linfócitos. 6. Peptídeos. 7. Quitosana. I. Góes, Alfredo Miranda de. II. Gomes, Dawidson Assis. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ELIZA MATHIAS MELO.
Aos vinte e um dias do mês de fevereiro de 2017 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Seleção e avaliação da atividade protetora de epítomos da proteína recombinante Pb27 na paracoccidioidomicose experimental", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dawidson Assis Gomes, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: aprovada; Dr. Maria Aparecida de Resende Stoianoff (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Maria de Fátima Martins Horta (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Alfredo Miranda de Góes Co-orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Dawidson Assis Gomes - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2017.

Dr. Maria Aparecida de Resende Stoianoff (UFMG) *Maria Aparecida de Resende Stoianoff*

Dra. Maria de Fátima Martins Horta (UFMG) *Maria de Fátima Martins Horta*

Dr. Alfredo Miranda de Góes Co-orientador (UFMG) *Alfredo Miranda de Góes*

Dr. Dawidson Assis Gomes - Orientador (UFMG) *Dawidson A. Gomes*

Lêda Quêrcia Vieira
Profa. Lêda Quêrcia Vieira
Coordenadora do Curso de Pós Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

Agradecimento

Agradeço a Deus pela benção da vida, pela minha trajetória e pelas pessoas que estão comigo.

Agradeço à minha mãe Angelina e ao meu pai Genaro pelo amor e cuidado dedicados a mim. Obrigada por me ensinarem a extrair sempre os pontos positivos de tudo o que acontece em nossa vida e dar valor a ela. Agradeço aos meus irmãos Jr e Bruno por toda amizade, carinho e incentivo ao meu trabalho. Vocês são importantíssimos para mim!

Agradeço ao Felipe, meu companheiro de vida e Pequeno gigante, por toda atenção, diversão, companheirismo, disponibilidade, amor, cuidado e conselhos.

Agradeço à minha amiga de infância, querida Ábia, por sempre estar presente em todas as etapas da minha vida de alguma forma.

Durante os meus anos de trabalho e aprendizado no LICM, eu aprendi que ninguém constrói sozinho. Somente com persistência e trabalho em equipe somos capazes de realizar com grande êxito nossos planos e objetivos. Trabalho em equipe é cooperar, participar, dividir, ser paciente, dialogar e planejar. Aprendi muito com vocês, especialmente com a equipe paracoco que sempre se renova e continua ótima. Estefânia, Elis, Dani, Junnia, Camila e Luciana sem vocês não seria possível realizar este trabalho e sonho. Ter amizade de vocês e estar com vocês é um prazer. Agradeço à Cíntia, Pricila, Betinha, Joyce, Thaís, Ludmila, Thalita e prof Andreia, pessoas iluminadas e amigas que me trazem paz e alegria.

Agradeço imensamente ao chefe Alfredo pela oportunidade de trabalho, confiança e por me aproximar da ciência. Você não imagina o quanto é importante na minha formação e o quanto eu agradeço por ter sido sua orientanda, uma das “rapas do tacho”. Continuaremos com nossa amizade! “Ihuu”.

Agradeço ao LICM 2 (Andrea, Camila, Mari K., Mari Izabela, Marcelo, Michele, e Joana) por toda disposição, alegria e ajuda. Foi muito bom ser parte deste grupo

lindo. Assim como ao prof Dawidson por ter aberto as portas do lab junto com chefe Alfredo. Sempre me ajudou sem hesitar em tudo o que eu precisei. Sempre é muito atencioso e disposto ao participar da minha orientação.

Obrigada aos prof. Geovanni Cassali, Diego Reis, Davyston, prof Ricardo de Avila, prof Carlos Chavez e prof Ronaldo Nagem por contribuírem para o desenvolvimento do nosso trabalho.

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

Todos vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo termodimórfico endêmico na América Latina que causador da doença paracoccidioidomicose (PCM). A terapia convencional para esta micose envolve alto custo financeiro, longos períodos de tratamento resultando em sequelas e frequentes recidivas. O objetivo deste trabalho é selecionar epítomos da proteína Pb27, identificado como antígeno do fungo, para usá-los na formulação de vacina terapêutica contra a PCM. Seis dos vários epítomos preditos por linfócitos B e T foram selecionados por meio do imunoensaio de peptídeos em *spot* frente aos soros humanos. Estes peptídeos da Pb27 foram sintetizados e utilizados como vacinas de peptídeos adsorvidos nas nanopartículas de quitosana (NpCHO), em camundongos infectados. Posteriormente, eutanásias foram realizadas para análise do pulmão e do soro. O ensaio de unidade formadora de colônia demonstrou que a vacina terapêutica composta por NpCHO peptídeos soltos (PEP SOL) reduziu a carga fúngica a níveis indetectáveis e NpCHO peptídeos ligados (PEP LIG) reduziu a carga fúngica significativamente. O ELISA demonstrou níveis de IgG mais altos em animais que receberam a vacina terapêutica de NpCHO PEP LIG em relação ao grupo controle e NpCHO PEP SOL menor nível de IgG em relação ao controle. Principalmente o peptídeo 60 e 76 foram os peptídeos mais reconhecidos por IgG do grupo NpCHO PEP LIG em relação ao grupos controle. Somente no 2º Ponto de Eutanásia, o peptídeo 76 foi reconhecido significativamente por IgG presente no grupo NpCHO PEP SOL. Principalmente o subtipo IgG 1 foi detectado em maior nível no soro do dos animais vacinados com NpCHO PEP LIG em relação ao controle. IgG 2a e IgG 2b também foram detectados significativamente no soro de camundongos vacinados com NpCHO PEP LIG. Em análise histológica foi possível observar redução de células fúngicas e infiltrado inflamatório nos pulmões de animais vacinados com NpCHO PEP LIG e NpCHO PEP SOL preservando a sua morfologia. Foi possível observar potencial na vacina de peptídeos associados a nanopartículas de quitosana contra PCM como uma alternativa de terapia.

Palavras-chave: predição; linfócitos; epítomos; peptídeos; pb27r; quitosana; *P. brasiliensis*

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is a thermodynamorphic fungus endemic in Latin America that causes a systemic mycosis called paracoccidioidomycosis (PCM). Conventional therapy for this mycosis involves a high financial cost, long treatment periods resulting in sequelae and frequent relapses. Therefore, the aim of this work is to select epitopes of the Pb27 protein, identified as antigen of the fungus, to use them in the formulation of therapeutic vaccine against PCM. 6 of the various epitopes predicted by B and T lymphocytes were selected by peptide immunoassay in spot against human sera. These peptides of Pb27 were synthesized and used as peptide vaccines (linked or unlinked) adsorbed on chitosan nanoparticles (NpCHO) in previously infected mice. Subsequently, two Euthanasia Points were performed for lung and serum analysis of the animals. The Colony Forming Unit assay demonstrated that therapeutic vaccine made up of NpCHO unlinked peptides (PEP SOL) reduced the fungal load to undetectable levels and NpCHO linked peptides (PEP LIG) reduced fungal load significantly. ELISA assay showed higher IgG levels in animals receiving the therapeutic NpCHO PEP LIG and NpCHO PEP SOL showed lower IgG levels, both compared to the control group. Primarily peptide 60 and 76 were the peptides most recognized by IgG of the animal group vaccinated with NpCHO PEP LIG compared to the control group. Primarily the subtype IgG 1 was detected at a higher level in animals serum vaccinated with NpCHO PEP LIG compared to the control. IgG2a and IgG2b were detected significantly in mice serum vaccinated with NpCHO PEP LIG. In histological analysis it was possible to observe reduction of fungal cells and inflammatory infiltrate in lungs of animals vaccinated with NpCHO PEP LIG and NpCHO PEP SOL preserving its morphology. It was possible to observe potential in peptide vaccine associated chitosan nanoparticles against PCM as an alternative therapy.

Key words: epitopes; peptide; *P. brasiliensis*; chitosan; prediction; lymphocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cultura de <i>P. brasiliensis</i> na forma micelial	19
Figura 2: Cultura de <i>P. brasiliensis</i> leveduriforme	19
Figura 3: Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose	21
Figura 4: Ciclo biológico hipotético de <i>Paracoccidioides</i> sp.	24
Figura 5: Representação esquemática dos diferentes tipos de epítomos	33
Figura 6: Formação de quitosana a partir da desacetilação de quitina	39
Figura 7: Detecção de anticorpos anti-Pb27r em pacientes com PCM	60
Figura 8: Disposição dos 136 epítomos preditos em membrana de celulose; 6 peptídeos selecionados e demonstrado em gráfico frente aos diferentes grupos de soros humanos; 6 peptídeos selecionados e ressaltados em membrana de celulose frente aos diferentes grupos de soros humanos; 13 epítomos reativos aos soros de pacientes com PCM	60-61
Figura 9: Medição do tamanho em diâmetro da NpCHO por meio do DLS	65
Figura 10: Imagem de MET da NpCHO com barra de escala de 200 nm	66
Figura 11: Desenho da linha do tempo experimental	67
Figura 12: Porcentagem dos grupos de camundongos que sobreviveram durante os 56 dias após a infecção	67
Figura 13: Detecção de UFCs em pulmões de camundongos infectados com 3×10^5 células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> e analisados nos pontos de eutanásia de 49 e 56 dias após a infecção	68
Figura 14: Detecção de níveis de IgG anti-peptídeos da Pb27r em placa sensibilizada com pool de peptídeos	69

Figura 15: Detecção de níveis de subtipos de IgG anti-peptídeos da Pb27r em placa sensibilizada com <i>pool</i> de peptídeos	70
Figura 16: Avaliação da reatividade entre os soros de grupos com vacinação terapêutica e os 6 peptídeos testados isoladamente	73
Figura 17: Avaliação histológica, por coloração de HE, do pulmão com 49 dias após a infecção	75-77
Figura 18: Avaliação histológica, por coloração de HE, do pulmão com 56 dias após a infecção	78-80
Figura 19: Avaliação histológica, por coloração de tricômio de gomori, do pulmão.....	81-82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração inibitória mínima da quitosana contra microrganismos	40
Tabela 2: Amostras de soros testados por ELISA e Imunoensaio dos peptídeos pontuais na membrana de celulose	46
Tabela 3: Grupos experimentais e composição da vacina terapêutica	53
Tabela 4: Localização dos 20 epítomos (posição inicial) na sequência da Pb27r, sequência de aminoácidos dos epítomos e pontuação de cada epítopo	57
Tabela 5: Localização dos 55 epítomos (posição inicial) na sequência da Pb27r e sequência de aminoácidos dos epítomos	58
Tabela 6: Sequência de epítomos de linfócitos B e T selecionados e ressaltados	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Por cento

ANOVA – Análise de variância, do inglês *analysis of variance*

APC - Célula apresentadora de antígeno

BCIP – 5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina

BHI – Infusão de cérebro e coração do inglês *Brain Heart Infusion*

BIOEST – Laboratório de Biologia Estrutural

BSA – Albumina sérica bovina do inglês *Bovine Serum Albumin*

CEUA – Comissão Ética no Uso de Animais

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

CTR-DIP – Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias

Orestes Diniz

DIC – N,N-diisopropilcarbodiimida

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz do inglês *Dynamic Light Scattering*

DMF – N,N-dimetilformamida

DPI – Pontos por polegada do inglês *Dots per Inch*

EDT – Etanodítilol

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

Fmoc – Fluorenil-metil-oxicarbonila

GLUT – Glutaraldeído

HOBT – Hidroxibenzotriazol

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

L – litro

LaMPaC – Laboratório de Materiais e Pilhas a Combustível

LICM – Laboratório de Imunologia Celular e Molecular

M – Molar

MTT – Tetrazólio3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromide

nm – Nanometro

nmol – Nanomol

NpCHO – Nanopartícula de quitosana

°C – Grau Celsius

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

Pb27r – Proteína recombinante de 27 kDa de *Paracoccidioides brasiliensis*

PbAg – Antígeno total de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS – Tampão fosfato de sódio

PBS-T – Tampão fosfato de sódio – Tween-20

PCM – Paracoccidioidomicose

pH – Potencial hidrogeniônico

PVPI – Iodopovidona

RPM – Rotação por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

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

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

TES – Trietilsilano

TFA – Ácido trifluoracético

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

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

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

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

TMB – Tetrametilbenzidina

UFC – Unidade formadora de colônia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

YPD – Meio composto de extrato de levedura (do inglês: yeast extract), peptona de carne e D-glucose, utilizado para o cultivo de células leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis*

β – Beta

μ – Micro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Histórico da paracoccidiodomicose	16
1.2 Agente etiológico	16
1.3 Epidemiologia	19
1.4 Patogênese e formas clínicas	20
1.5 Resposta imunológica	22
1.6 Diagnóstico	24
1.7 Tratamento	25
1.8 Controle de cura	26
1.9 Proteína recombinante Pb27	27
1.10 Predição de epítomos	29
1.10.1 Epítomos de linfócitos T	30
1.10.2 Epítomos de linfócitos B	32
1.11 Mapeamento de epítomos	33
1.12 Adjuvantes	33
1.12.1 Quitosana	34
2 JUSTIFICATIVA	37
3 OBJETIVO	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Predição de epítomos	39
4.1.1 Epítomos de linfócitos B	39
4.1.2 Epítomos de linfócitos T	39
4.2 Síntese de peptídeos na membrana de celulose – Spot síntese	39
4.3 A proteína Pb27r	40
4.4 Os soros de pacientes com paracoccidiodomicose	40
4.5 ELISA utilizando proteína Pb27r	41
4.6 Imunoensaio de peptídeos pontuais ligados na membrana de celulose – Imunoensaio de Spot	42
4.6.1 Ligações entre anticorpos e peptídeos na membrana de celulose	42
4.6.2 Regeneração da membrana	43

4.7 Síntese química dos peptídeos solúveis	43
4.8 Polimerização dos peptídeos com glutaraldeído	43
4.9 Produção de nanopartículas de quitosana	44
4.10 Caracterização das nanopartículas de quitosana.....	44
4.10.1 Espalhamento de Luz Dinâmico e potencial Zeta.....	44
4.10.2 Microscopia eletrônica de transmissão – MET	45
4.11 Adsorção de peptídeos da Pb27r nas nanopartículas de quitosana	45
4.12 Cultura de <i>P. brasiliensis</i>	45
4.13 Paracoccidiodomicose experimental	46
4.13.1 Infecção intratraqueal.....	46
4.13.2 Vacinação terapêutica.....	46
4.13.3 Pontos de eutanásia	47
4.13.4 Curva de Sobrevivência	47
4.14 Ensaios de proteção	47
4.14.1 Unidades formadoras de colônias	47
4.14.2 ELISA utilizando peptídeos da Pb27r.....	48
4.14.3 Histologia	48
4.15 Análises estatísticas	49
5 RESULTADOS	50
5.1 Predição de epítomos da proteína Pb27r.....	50
5.1.1 Linfócito B.....	50
5.1.2 Linfócito T	51
5.2 Seleção de soros humanos reativos à ELISA utilizando Pb27r e soros humanos	54
5.3 Seleção de peptídeos por imunoensaio em membrana de celulose.....	54
5.4 Caracterização das nanopartículas de quitosana.....	59
5.4.1 Potencial Zeta e Espalhamento de Luz Dinâmico da NpCHO	59
5.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	60
5.5 Ensaio de proteção	61
5.5.1 Sobrevivência após a infecção.....	61
5.5.2 Determinação da atividade protetora da formulação vacinal pela avaliação das UFCs.....	62
5.5.3 Avaliação da produção de Imunoglobulinas por ELISA utilizando peptídeos selecionados da Pb27.....	63
5.5.4 Avaliação histológica dos pulmões dos camundongos infectados e ou vacinados após 1º e 2º Ponto de Eutanásia.....	68

6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÃO.....	81
REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) anteriormente foi denominada como Blastomicose Sul-Americana, Granulomatose Paracoccidióidica, Doença de Lutz-Splendore-Almeida, Granuloma Paracoccidióidico, Granulomatose Blastomicóide Tropical e Granuloma Ganglionar Maligno de origem Blastomicótica. A PCM começou a ser descrita na cidade de São Paulo, em 1908, pelo médico brasileiro Adolpho Lutz (1855-1940) que notificou os sintomas, avaliou lesões orais e identificou o agente etiológico como um fungo dimórfico diferente de *Coccidioides immitis*, agente etiológico da doença Posadas-Wernicke (Lutz, 1908).

Em 1912, Alphonso Splendore (1871-1953), na Santa Casa da Misericórdia de São Paulo, estudou a morfologia do fungo de forma aprofundada e o classificou no gênero *Zymonema* como *Zymonema brasiliensis* (Lacaz, 1982).

Em 1930, Floriano de Paulo Almeida (1898-1977) realizou estudos sobre a reprodução e cultivo do fungo, levando-o a criar um novo gênero dentro do reino Fungi de acordo com as regras estabelecidas por Linneu. O nome do gênero foi revalidado para *Paracoccidioides* por apresentar semelhanças morfológicas ao *Coccidioides immitis* e o nome da espécie, dado por Splendore, foi mantida sendo denominada como *Paracoccidioides brasiliensis* (Almeida, 1930).

Durante a reunião de micologistas das américas, em Medellín (Colômbia), foi oficializado o termo paracoccidioidomicose e desde 1971 o termo é aceito mundialmente (Lacaz, 1991; Brummer *et al.*, 1993).

1.2 Agente etiológico

Paracoccidioides brasiliensis pertence, taxonomicamente, ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Pleomyceto, ordem Onigenales, família Onygenaceae, gênero *Paracoccidioides* e espécie *brasiliensis* (San-Blas *et al.*, 2002). Esta espécie é constituída por 3 grupos filogeneticamente distintos: *P. brasiliensis* S1 ou PS1 ou PS3 (Matute *et al.*, 2006). A espécie filogenética PS3 é encontrada somente na Colômbia. PS2 é encontrada no Brasil e Venezuela. S1, que é representada pela cepa Pb18, também é encontrada no Brasil e Venezuela, além de Argentina, Paraguai e Peru (Theodoro *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2014). A cepa Pb18 foi descrita por apresentar virulência em camundongos infectados pela via intraperitoneal, intratraqueal e intravenosa (Calich *et al.*, 1998).

P. brasiliensis é um fungo descrito na sua forma assexuada que apresenta dimorfismo termo dependente com capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais como meio de cultivo e, principalmente, temperatura de incubação quando ocorre a infecção (Lutz, 1908; Brummer *et al.*, 1993; Lacaz, 2002; Restrepo *et al.*, 2011).

Quando *P. brasiliensis* cresce em temperatura entre 19 e 28°C (habitat natural), é denominado micelial (Figura 1). Macroscopicamente (Figura 1a) são observadas estruturas filamentosas com propágulos infectantes denominados conídios formando colônias brancas ou pigmentações difusas marrom aderentes ao meio. Microscopicamente (Figura 1b) são observadas hifas delgadas, septadas, multinucleadas e ramificadas com presença de clamidósporos terminais ou intercalares. Quando os conídios são inalados ou cultivados em meio rico de nutriente na temperatura entre 35 e 37°C (temperatura corporal), é denominado leveduriforme (Figura 2). Macroscopicamente (Figura 2a) apresentam colônias de cor creme cerebriiformes. Microscopicamente (Figura 2b) são observadas células arredondadas ou ovais com 4-30 µm de diâmetro, paredes celulares espessas birrefringentes, multinucleadas e com multibrotamentos de células filhas agrupadas ao lado da célula mãe (Brummer *et al.*, 1993; Lacaz, 2002; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Restrepo *et al.*, 2011).

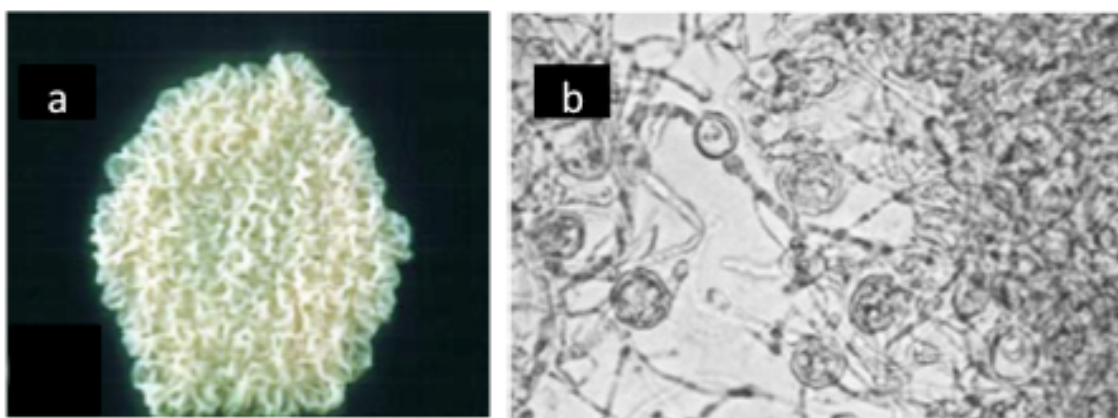


Figura 1: Cultura de *P. brasiliensis* na forma micelial. (a) Aparência micelial macroscópica (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006 Adaptado). (b) Aparência micelial microscópica (Corredor *et al.*, 1999 Adaptado).

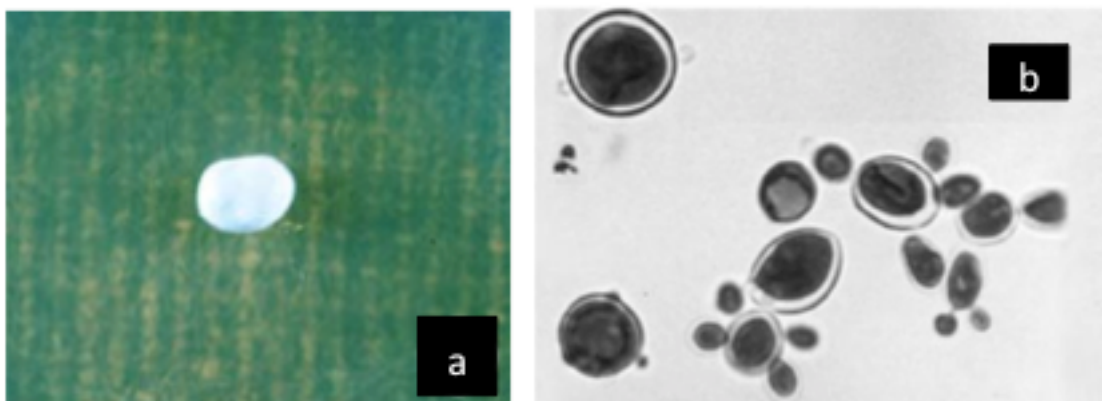


Figura 2: Cultura de *P. brasiliensis* leveduriforme. (a) Aparência de levedura macroscópica (Sikanai-Yasuda *et al.*, 2006 Adaptado). (b) Aparência leveduriforme microscópica (Corredor *et al.*, 1999 Adaptado).

A transformação da fase micelial para a leveduriforme acontece por meio do complexo de proteínas-polissacarídeos presentes na parede celular do fungo. Esta é uma estrutura intercambiável cuja composição e organização estrutural são reguladas durante o ciclo celular de acordo com as mudanças nas condições ambientais. No dimorfismo de *P. brasiliensis* é apresentado quitina como polissacarídeo comum, com o carboidrato β -1,3-glucana predominante na forma micelial e α -1,3-glucana predominante na fase leveduriforme. Esses polissacarídeos são fibrilares e determinam, até certo grau, do morfotipo do fungo (Kanetsuna *et al.*, 1972; San Blas & San-Blas, 1977; Restrepo, 1993).

Em 1985, San-Blas & San-Blas propuseram que a atividade combinada de β -glucanases e dissulfeto redutases, a parede celular das células leveduriformes ficam “afrouxadas” em torno das ilhotas discretas de β -1,3-glucanas. A 37°C, há alta atividade de dissulfeto redutases e alta síntese de quitina, ou seja, alta taxa de α -1,3-glucana em relação a β -1,3-glucana resulta no morfotipo leveduriforme. A 22°C, as dissulfeto redutases apresentam baixa atividade e a síntese de glucanas ocorrem em baixa velocidade. Assim longas fibrilas de β -1,3-glucana são formadas nos sítios nascentes.

Essa transição de fase é reversível e não vital para o ciclo de vida do fungo sendo mais uma adaptação de oportunidade às condições ambientais. Porém, a conversão para a fase leveduriforme é requisito para a progressão da infecção (San-Blas & Nino-Vega, 2001).

1.3 Epidemiologia

As áreas endêmicas da PCM são situadas em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, com temperaturas médias entre 14 e 20°C, precipitações pluviométricas entre 800 e 2000 mm e umidade do ar relativamente alta (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012; Goes *et al.*, 2014). O Brasil possui o maior número de casos descritos de PCM, seguido da Colômbia, Venezuela e Guatemala (Hamdan & Rocha, 1987; Londero, 1998). A distribuição da PCM no Brasil é heterogênea, com maior prevalência nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Amazônia (Figura 3). Nos últimos anos foi observado um aumento crescente de registros de casos nos estados da região Centro-Oeste e Norte associados ao avanço da fronteira agrícola nos limites da floresta amazônica (Restrepo, 1993; Bopp, 1995; Moreira, 2008) .

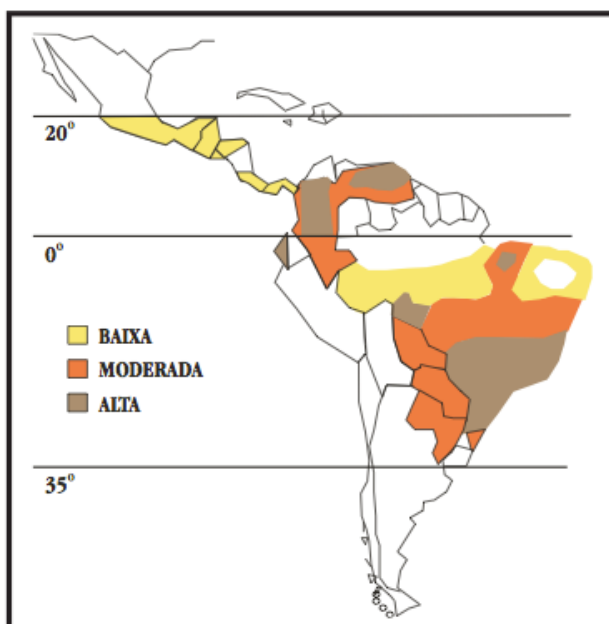


Figura 3: Distribuição geográfica da paracoccidiodomicose. Fonte: Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

Os dados reportados anualmente sobre incidência da PCM são imprecisos porque a doença não é de notificação compulsória, além de apresentar dificuldade de identificar o local onde a infecção ocorreu e a exata localização do patógeno no ambiente, uma vez que a doença pode ser assintomática ou pode apresentar um período de latência prolongado (Restrepo *et al.*, 2001). Todavia, 80% dos casos ativos estão reportados no Brasil, nas regiões Sul e Sudeste, e 1,4% estão infectados

também por HIV (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). A estimativa de incidência da PCM está entre 1 e 3 novos casos por 100.000 habitantes de áreas endêmicas da América Latina ao ano (Restrepo, 1993; Londero, 1998; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

Entre adultos (entre 30 e 50 anos de idade), há proporção de acometimento é entre 5,4 a 10 homens para 1 mulher devido o possível efeito protetor dos receptores de estrógeno na parede do fungo capazes de inibir a transformação de micelial para leveduriforme (Aristizabal *et al.*, 2002; Goes *et al.*, 2014). Porém, na infância não ocorre diferença significativa de acometimento entre os sexos. Foi observado que após os 50 anos de idade o acometimento nas mulheres volta a ser como descrito na infância (Goes *et al.*, 2014).

O acometimento é preferencialmente em trabalhadores rurais (44,3 a 76,2%) e da construção civil (5 a 20%), que são, em geral, oriundos de áreas rurais. A PCM tem sido identificada, nas últimas décadas, com mais frequência em zonas urbanas, mesmo em indivíduos que nunca saíram dos grandes centros populacionais (Paniago, 2003; Goes *et al.*, 2014).

A PCM compõe o grupo de doenças infecciosas negligenciadas, pois não recebe atenção das instituições envolvidas em políticas de saúde pública e da indústria farmacêutica que não investe no desenvolvimento de novos antifúngicos. A PCM no Brasil não se encontra incluída entre as doenças negligenciadas (Hotez *et al.*, 2008; Pedrosa *et al.*, 2008; Martinez, 2010; Goes *et al.*, 2014).

A taxa de letalidade da PCM é entre 2 e 23%, atingindo 30% se associada a AIDS (Martinez, 1996; Paniago, 2003). Os custos sociais e econômicos da PCM são elevados ao afetar indivíduos em fase produtiva, determinar sequelas secundárias permanentes e impedir, muitas vezes, o retorno do paciente ao seu trabalho original (Brummer, 1993; Pereira *et al.*, 2004; Mendes & Shikanai-Yasuda, 2003).

1.4 Patogênese e formas clínicas

A infecção paracoccidioidomycótica ocorre quando os conídios são inalados pelo hospedeiro atingindo as unidades bronquíolo-alveolar, e devido ao dimorfismo, se diferenciam em células leveduriformes passando a multiplicar-se por brotamentos múltiplos (Brummer *et al.*, 1993; Ferreira, 2009; Goes *et al.*, 2014). Ciclo biológico hipotético do agente etiológico da PCM (Bagagli *et al.*, 2008).

No pulmão surge um processo inflamatório inicialmente rico em neutrófilos que são, progressivamente, substituídos por células mononucleares (linfócitos e

macrófagos) que após determinado tempo culminarão na formação de granulomas (Soares *et al.*, 2000; Fortes *et al.*, 2011).

A resposta imunológica do hospedeiro determinará a evolução do complexo primário, desde assintomático até com sintomatologia intensa e grave. O fungo pode ser disseminado para outros órgãos por via linfática ou hematogênica se tornando sistematizada, de acordo com a extensão e intensidade da reação inflamatória, com a carga fúngica inalada e da virulência da cepa de *P. brasiliensis* (Soares *et al.*, 2000; Fortes *et al.*, 2011; Goes *et al.*, 2014).

Sabe-se que a doença é assintomática por longo período de tempo e, geralmente, o diagnóstico é realizado em estágios avançados da destruição tecidual de órgãos vitais, principalmente pulmão (Soares *et al.*, 2000; Fortes *et al.*, 2011; Goes *et al.*, 2014).

Por outro lado, em vez de serem disseminadas, as células fúngicas podem ser eliminadas por células do sistema imune (Brummer *et al.*, 1993; Ferreira, 2009, Goes *et al.*, 2014).

De acordo com o consenso realizado em Medellín, Colômbia em 1986, a PCM pode ser classificada de quatro maneiras: 1. PCM-infecção, período em que a doença se encontra assintomática. O hospedeiro pode desenvolver resposta imunológica específica contra o fungo, fase evidenciada pela intradermoreação positiva com paracoccidioidina; 2. PCM-aguda (tipo juvenil), é caracterizada por representar a evolução mais rápida da doença, geralmente grave, podendo ocorrer linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas acometendo principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens; 3. PCM-crônica (tipo adulto), a doença progride lenta e silenciosamente, após período de latência variável. Pode ser unifocal ou envolver mais de um órgão ao mesmo tempo, acometendo principalmente o pulmão, mucosas e pele de indivíduos entre 30 e 50 anos de idade; 4. PCM-residual ou sequelar, é observada a ausência de fungos viáveis e encontro de áreas de fibrose que determinam disfunções do tecido afetado (Menino *et al.*, 2013; Morais *et al.*, 2015).

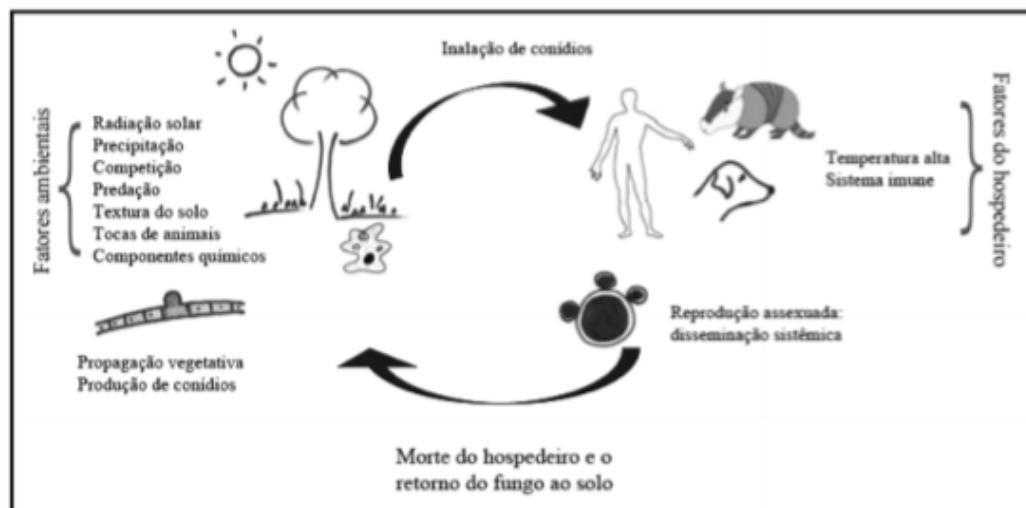


Figura 4: Ciclo biológico hipotético de *Paracoccidioides sp.* Fonte: Bagagli *et al.*, 2008. Adaptado/traduzido.

1.5 Resposta imunológica

A instalação da PCM, a sua propagação e gravidade dependerão de fatores inerentes ao fungo, como a virulência, espécie envolvida e composição antigênica, e também dependerá de fatores relacionados a capacidade do hospedeiro de desenvolver uma resposta imune eficaz (Calich *et al.*, 2008).

Ao se tratar de resposta imune eficaz, é descrito que *P. brasiliensis* sintetiza antígenos metabólicos que interagem com o sistema imune do hospedeiro, causando uma resposta imunológica altamente complexa e multifatorial. Estudos clínicos e experimentais sugerem que mecanismos de defesa determinem a resistência de *P. brasiliensis* (Calich *et al.*, 2008; Fortes *et al.*, 2011).

A imunidade inata é definida como a primeira fase da resposta imune, formada por elementos que interagem diretamente com todos os tipos de microrganismos. Esta é mediada por barreiras físicas, elementos químicos e componentes celulares do sistema imunológico. O reconhecimento do microrganismo pela imunidade inata é mediado pelos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR) que interagem com estruturas conservadas do patógeno que os Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMP) (Calich *et al.*, 2008; Bonfim *et al.*, 2009). Há também mecanismos como ativação de proteínas do complemento, o reconhecimento dos PAMPs por receptores TLR (Toll Like Receptor), atividade microbicida de células Natural Killer (NK) e fagócitos, além de produção de citocinas inflamatórias, desempenham importante função na resposta do hospedeiro aos patógenos (Calich *et al.*, 2008).

Como a infecção por *P. brasiliensis* acontece por inalação dos conídios atingindo primeiramente o pulmão, a resposta imunológica é iniciada pela secreção de várias proteínas antimicrobianas no epitélio pulmonar e pela atividade fagocítica de macrófagos alveolares locais. A interação macrófago-patógeno resulta na internalização do fungo pela célula ativada que pode eliminar o microrganismo através da ação de espécies reativas do oxigênio, enzimas líticas ou contenção microbiana Calich *et al.*, 2008).

Em relação à resposta imune adaptativa, acredita-se que o controle da infecção seja dependente principalmente da resposta imune celular efetiva, geralmente associada ao padrão tipo 1 da resposta imunológica, caracterizado pela síntese de citocinas que ativam macrófagos e linfócitos T resultando na formação de granulomas compactos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Calich *et al.*, 2008; Fortes *et al.*, 2011).

A formação de granulomas limita o espaço físico do patógeno em um local altamente concentrado de células do sistema imune, mas muitas vezes não é possível erradicar a infecção. Porém, a proliferação e disseminação do patógeno seriam maiores sem a formação de granulomas, como observado em indivíduos susceptíveis que apresentam granulomas dispersos (Souto *et al.*, 2000; Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Ramakrishnan, 2012). Os macrófagos que formam um granuloma podem se fundir e formar células gigantes multinucleadas. Outros tipos celulares também formam o granuloma, como os neutrófilos, células dendríticas, linfócitos B e T, células NK e fibroblastos (Ramakrishnan, 2012).

Em modelo murinho, a resistência de camundongos fêmea está associada ao fator hormonal, que induz resposta TH1, logo, está indiretamente associada ao tipo de resposta imune celular. O hormônio estrógeno influencia a produção de altos títulos de IFN- γ , TNF- α e IL-12, com alta produção de óxido nítrico e baixa IL-1- e IL-4, direcionando a resposta para TH1 e assim gerando menor susceptibilidade. Já em machos, por influência de testosterona, ocorre o contrário, ou seja, são produzidos baixos títulos de IFN- γ , TNF- α e IL-12, com baixa produção de óxido nítrico, altos títulos de IL-10 e IL-4. Por tanto machos são mais susceptíveis porque a testosterona direciona a imunidade celular para uma resposta TH2 (Pinzan *et al.*, 2010).

Em humanos, pacientes com PCM apresentam baixa na resposta tipo 1, esta alteração se correlaciona com a gravidade da doença. Neste contexto, formas severas da PCM progridem para o predomínio de resposta imunológica tipo 2, onde há maior ativação de linfócitos B, altos títulos de anticorpos específicos, cuja magnitude está

relacionada a gravidade e disseminação da doença (Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A resposta imune humoral é descrita por ter pouca eficiência da defesa contra PCM. A doença se caracteriza por apresentar a produção de títulos significativamente elevados de anticorpos, IgG e IgA, associados a prevalência de citocinas que suprimem o granuloma. Pesquisadores se esforçam para correlacionar a classe de imunoglobulinas anti-*P. brasiliensis* (detectadas em soro) com a forma clínica ou estágio da doença e susceptibilidade ou resistência.

Sendo assim, imunoglobulinas têm sido estudadas durante as diferentes fases das formas clínicas da PCM humana, porém como o resultado dos diferentes estágios da doença, o efeito do tratamento e dados coletados com o estudo dos pacientes geralmente são contraditórios. Pacientes na forma aguda da doença (83,4%) apresentam níveis mais altos de IgG anti-*P. brasiliensis*. Já em pacientes na fase crônica da PCM, os níveis de IgG detectado foi em menor frequência. Os anticorpos específicos para *P. brasiliensis* presentes no pacientes crônicos são principalmente da subclasse IgG 1. Os subtipos IgG 2a, e IgG 2b foram descritos por possuírem efeitos protetores durante o processo infeccioso (Unterkircher *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2012).

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da PCM se baseia na identificação direta, a fresco, em espécimes clínicos variados; exame histopatológico; ou cultura do fungo, todos considerados métodos padrão-ouro; ou exames hematológicos, sorológicos, de detecção de antígenos, de biologia molecular, funcionais de imagem (Brummer *et al.*, 1993; Martinez, 2010).

Todos os métodos possuem limitação, sendo necessário reunir evidências clínicas aos resultados laboratoriais para conclusão do diagnóstico.

O método mais preciso de diagnóstico da PCM se trata da visualização direta das células fúngicas de amostras obtidas de lesões cutâneas, mucosas, aspirado ganglionar, entre outros. Já em teste sorológico, a Pb27r apresentou cerca de alta especificidade em soros de pacientes infectados. Além do mais, testes sorológicos são importantes por permitir avaliação da resposta imune do hospedeiro e por proporcionar informações relevantes do prognóstico da PCM (Correa *et al.*, 2006; Ferreira, 2009; Fernandes *et al.*, 2011c).

1.7 Tratamento

O tratamento contra a PCM inclui drogas antifúngicas e medidas de suporte às complicações associadas, como a disseminação, má nutrição e outras sequelas (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A escolha da droga a ser administrada depende de várias circunstâncias, como a gravidade clínica, história prévia de resistência terapêutica, capacidade de absorção gastrointestinal do fármaco, associação a outras doenças e adesão ao tratamento. O *P. brasiliensis* é sensível a maioria dos antifúngicos, incluindo sulfonamidas, azóis (Cetoconazol, Fluconazol, Itraconazol, Posaconazol, Voriconazol) e Anfotericina B que são os usados contra a PCM (Brummer *et al.*, 1993; Biscotto & Pedroso, 2006; Menezes, *et al.*, 2006; Mendes 2009; Ambrósio *et al.*, 2014).

As sulfonamidas foram as primeiras utilizadas na terapia contra PCM, em 1940, por Domingos de Oliveira Ribeiro (Brummer *et al.*, 1993). Atuam bloqueando a formação de ácido fólico, um precursor dos ácidos nucleicos (Menezes *et al.*, 2006). Elas podem ser administradas por via oral e atualmente são obtidas gratuitamente no Brasil através do Sistema Público de Saúde. Entretanto, as sulfas apresentam desvantagens de um tratamento longo (5 anos ou mais), devem ser administradas várias vezes ao dia e possuem alto índice de recidivas (20-30%) acompanhados de resistência induzida do fungo (Brummer *et al.*, 1993; Palmeiro *et al.*, 2005).

A Anfotericina B, introduzida em 1958, é utilizada em pacientes com PCM severa (Brummer *et al.*, 1993). Ela atua se ligando ao ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana fúngica e causando perda de potássio e outras moléculas pequenas. O tratamento é longo e deve ser administrado por via intravenosa, sendo assim é necessária a hospitalização do paciente. Os efeitos colaterais, como arritmia cardíaca, insuficiência renal, nefrotoxicidade e altos índices de recidivas, podem levar a morte (Menezes *et al.*, 2006). Já existe uma nova formulação lipídica da Anfotericina B com menores efeitos colaterais, porém o custo é bastante elevado (Antoniadou & Dupont, 2005).

Os azóis foram utilizados, em 1978, como as drogas mais efetivas do tratamento contra PCM. Eles possuem formulações orais e intravenosa atuando na prevenção da síntese de ergosterol pelo fungo (Palmeiro *et al.*, 2005; Menezes *et al.*, 2006). O Itraconazol é sugerido como opção terapêutica de controle das formas leves e moderadas da doença. Eles apresentam poucos efeitos colaterais, baixos casos de

recidiva (3-5%) e menor duração do tratamento (8 a 18 meses). Estes medicamentos estão disponíveis de forma limitada no Sistema Único de Saúde. O Voriconazol é antifúngico de segunda geração que apresenta boa retenção pelo sistema nervoso central e é recomendado para a terapia da neuro-PCM (Georgiev, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

Os tratamentos são caracterizados pela necessidade de acompanhamento médico durante meses ou anos. Como a PCM afeta principalmente indivíduos com baixos recursos sócio-econômicos, torna-se inviável o uso de antifúngicos que não são disponibilizados pela rede pública de saúde (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Tais desvantagens apresentam como consequência a descontinuidade do tratamento, altas frequências de recidivas e sequelas. Por tais motivos, é necessária a introdução de modelos alternativos de tratamento e mais eficientes na promoção de proteção.

1.8 Controle de cura

O momento adequado para a interrupção do tratamento continua controverso. Deve perdurar até que sejam observados os critérios de cura determinados por parâmetros:

- Clínicos: caracterizados pela regressão dos sinais e sintomas, cicatrização de lesões e involução das linfonodopatias. A melhora pode ser rápida, aproximadamente 5 meses, infundindo no paciente a sensação de que não precisa mais da medicação e desejo de interrompê-la, mesmo sem a autorização médica. Com essa interrupção no tratamento, ocorre a instalação de recidiva da PCM.
- Radiológicos: estabilização das imagens radiológicas, manutenção das mesmas lesões cicatriciais em cinco radiografias realizadas ao longo de um ano;
- Imunológicos: negatização dos títulos de imunodifusão dupla ou estabilização do título em valores até 1:2, observada em três amostras de soro em intervalo de dois meses. Deve ser considerado que a relação entre níveis de IgG e de quimiocinas, com a melhora clínica, nem sempre é direta. Então somente a sorologia não deve indicar a cura da PCM.
- Micológica: pesquisa negativa do fungo em exame das secreções nas quais foi anteriormente identificado;
- Aparente: refere-se à cura clínica, micológica, radiológica e imunológica durante dois anos, sem receber tratamento de reforço (Brummer *et al.*, 1993;

Calegaro, 1994; Restrepo *et al.*, 2008; Mendes, 2009; Pedroso *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2006; Lyon *et al.*, 2009).

É frequente a observação de pacientes que apresentam recidiva da PCM cada vez que o tratamento é interrompido. Dessa forma, existe a necessidade de definição de parâmetros ou testes laboratoriais de mais segurança para a tomada de decisão quanto a duração da terapia, ou formas de tratamento mais eficientes (Ambrósio *et al.*, 2014).

1.9 Proteína recombinante Pb27

Os antígenos induzem respostas imune específicas, reconhecidas por linfócitos ou anticorpos. *P. brasiliensis* sintetiza muitos antígenos que podem ser relevantes na resposta imune do hospedeiro. De acordo com a origem, os antígenos são classificados como derivados da parede celular, citoplasmático e filtrados de cultura (exoantígenos). Entretanto, as preparações antigênicas podem variar dependendo do isolado do fungo, tempo de incubação, meio de crescimento e fase de crescimento (Brummer *et al.*, 1993).

Durante a infecção, a parede celular está em contato direto com o hospedeiro e esta parede celular é cheia de moléculas antigênicas. Em *P. brasiliensis*, como em outros fungos, a parede celular é composta por lipídios, quitina, glicanos e proteínas, porém devido ao dimorfismo, as proporções dos componentes são variáveis nas diferentes fases do fungo (micelial e leveduriforme) (Tomazett *et al.*, 2005). Em 1969, Kanetsuna e colaboradores estudaram a composição da parede celular de *P. brasiliensis* demonstrando que há maior proporção de quitina na forma de levedura e maior proporção de proteínas na forma de micélio. Apesar da ausência de quitosana na parede celular das leveduras ou dos micélios, o gene que codifica a quitina deacetilase (enzima que transforma quitina em quitosana) foi encontrado super expresso em leveduras (Felipe *et al.*, 2005).

Em 1996, McEwen e colaboradores descreveram a clonagem e o sequenciamento de uma região genômica de *P. brasiliensis* que codificava uma proteína antigênica de aproximadamente 27 kDa que foi inicialmente denominada P27. Esta proteína, constituinte da fração F0 do antígeno total de *P. brasiliensis* (PbAg), foi a segunda proteína recombinante (Pb27r) de *P. brasiliensis* a ter seu gene clonado.

Ortiz e colaboradores (1998) utilizaram a proteína Pb27r, em ensaios de ELISA, para detecção de anticorpos reativos a ela em soros de pacientes com PCM. Este antígeno foi capaz de identificar a presença de anticorpos em 73,4% dos soros analisados (Ortiz *et al.*, 1998). Em 2003, Diéz e colaboradores, utilizaram a mistura da Pb27 associada a outra proteína recombinante de 87kDa de *P. brasiliensis* e observaram, nos ensaios de ELISA, boa sensibilidade e especificidade na detecção da PCM. A Pb27r apresentou boa sensibilidade aos soros, em conjunto ou individualmente, de pacientes com PCM ao ser usada em testes de dotblot. A Pb27r foi confirmada como sendo de grande valor no imunodiagnóstico de PCM (Correa *et al.*, 2007).

Diéz e colaboradores (1999) utilizaram a técnica de PCR para estudos ecológicos de *P. brasiliensis* e testaram a amplificação da sequência nucleotídica da Pb27 em solos artificialmente contaminados com o fungo e em tecidos de tatus capturados em área endêmica na Colômbia. O estudo mostrou que a sequência do gene codificador da Pb27 pode ser utilizada como marcador da presença do fungo em diferentes amostras.

Já em nosso laboratório, Reis e colaboradores (2008) estudaram a imunidade protetora induzida pela Pb27r e demonstraram que a imunização terapêutica de camundongos BALB/c com esta proteína, após infecção desafio, promoveu PCM no pulmão controlada associada a baixos níveis de mortalidade e presença de granulomas compactos, transformando a proteína em boa candidata para compor uma vacina contra o fungo a fim de diminuir o tempo de tratamento, diminuir recidivas e aumentar a eficiência do tratamento. Além disso, anticorpos específicos obtidos destes animais com imunização terapêutica foram capazes de localizar a proteína na superfície e no citosol (co-localizadas com mitocôndrias) de leveduras de *P. brasiliensis*.

Fernandes e colaboradores (2011b) demonstraram que a imunização com a Pb27r combinada ao Fluconazol evitou a disseminação do fungo para o baço e fígado de camundongos e controlou o crescimento de leveduras nos pulmões. Esta combinação aumentou os efeitos do quimioterápico Fluconazol na PCM experimental. Também foi demonstrada por Fernandes e colaboradores (2011a) a melhoria da eficiência ao usar Pb27r e Pb40r combinado ao Fluconazol reduzindo carga fúngica, infiltrado inflamatório no pulmão, baço e fígado. A Pb40 é outro antígeno de *P.*

brasiliensis clonado e estudado em nosso Laboratório de Imunologia Celular e Molecular.

Em 2013, Moraes e colaboradores mostraram que a imunização com Pb27r reduz os níveis de fibrose pulmonar induzida pela infecção por *P. brasiliensis* e apresentam efeitos na expressão de VEGF e seu receptor VEGFR2 impedindo que a sinalização destas moléculas seja reduzida durante o período de infecção. Já em 2015, Moraes e colaboradores demonstraram que TLR9 auxilia na proteção inicial contra PCM. Essa proteção foi induzida por meio da imunização com Pb27r.

1.10 Predição de epítomos

As proteínas antigênicas são muito importantes para produção de vacinas contra PCM. Neste contexto, à medida que o conhecimento sobre os alvos da resposta imune aumenta, mais ocorre a progressão sobre a utilização de abordagens reducionistas para formulação de vacinas, como compostos antigênicos específicos e epítomos imunodominantes (Purcell *et al.*, 2006).

Os epítomos são sítios específicos dos antígenos, reconhecidos por linfócitos, capazes de induzir resposta imune. Quando ocorre a terapia com a proteína, a maioria dos linfócitos reage ou interage para algumas sequências de aminoácidos, denominados epítomos imunodominantes (Akram & Inman, 2012). Em alguns casos, a formação de epítomos em uma proteína depende somente da estrutura primária, denominados epítomos lineares, que é constituída pela sequência de aminoácidos; em outros casos, a formação dos epítomos depende das estruturas tridimensionais devido a justaposição de aminoácidos, e estes são denominados epítomos conformacionais (Gershoni *et al.*, 2007).

Na figura 5, para exemplificar, a sequência de aminoácidos que fazem parte do epítomo representado pelas letras E-P-I-T-O-P-O, segue a sequência primária da proteína, sendo assim classificado de epítomo contínuo ou linear (Figura 5a). A sequência representada pelo mesmo conjunto de letras, não está seguindo a sequência primária da proteína. Neste caso, os aminoácidos que formam o epítomo estão próximos devido à conformação estrutural da proteína e por isso o epítomo é classificado como descontínuo ou conformacional (Figura 5b).

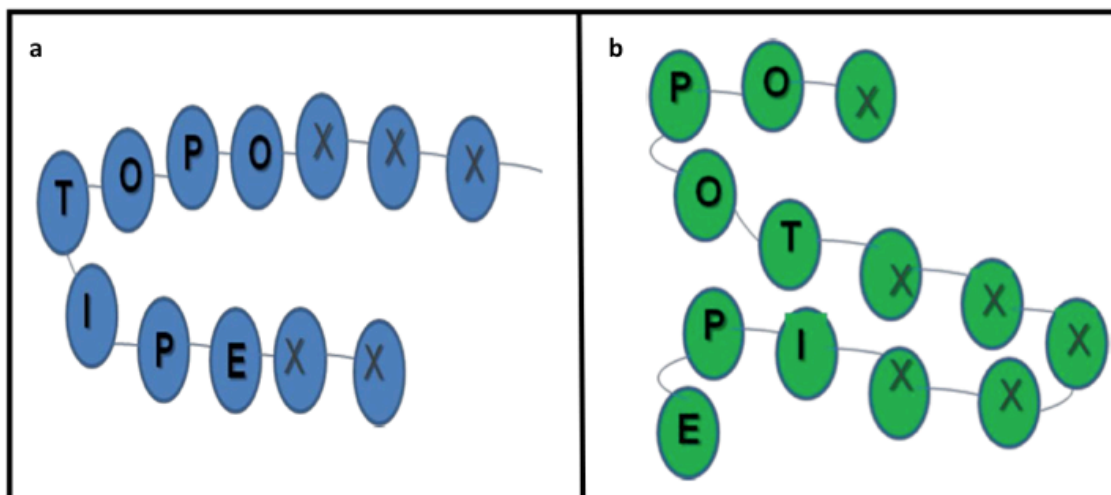


Figura 5: Representação esquemática dos diferentes tipos de epítopos. Cada círculo representa um aminoácido seguindo a sequência primária da proteína. Os círculos com letras são os aminoácidos que fazem parte do epítipo. (a) Mostra a representação esquemática de um epítipo linear. (b) Mostra a representação esquemática de um epítipo conformacional. Adaptado Avila, 2011.

A função principal dos epítopos no reconhecimento pelo sistema imune atraiu a atenção para o desenvolvimento de novas ferramentas de bioquímica e bioinformática na síntese e predição de epítopos. Portanto, o uso de epítopos sintéticos apresenta vantagens sobre o uso de proteínas nativas ou recombinantes por apresentar: ausência de material infeccioso, especificidade da resposta imune, ausência de recombinação genética, produção econômica e em larga escala, facilidade no controle de qualidade por meio da técnica espectrometria de massa, facilidade de transporte por meio da liofilização das preparações, entre outros (Jackson *et al.*, 2006).

Os epítopos podem ser úteis em diagnóstico de doenças, formulação de drogas, projetos de vacinas, entre outros (Regenmortel, 2001).

1.10.1 Epítopos de linfócitos T

O sistema imune adaptativo reconhece os epítopos por meio de três classes de moléculas: Complexo maior de histocompatibilidade de classe I ou II (MHC classe I e II), receptores de células T e anticorpos. As proteínas MHC de classe I e II se ligam ao epítipo em uma região denominada sulco ou fenda de ligação ao peptídeo. Enlaces de hidrogênio presentes em cada extremo da fenda limitam o tamanho dos

peptídeos na interação MHC de classe I. Em contrapartida, as proteínas MHC de classe II possuem uma fenda aberta que não limita o tamanho do peptídeo (Neefjes *et al.*, 2011).

O MHC de classe I está presente em quase todas as células e ele proporciona um mecanismo de apresentação dos peptídeos derivados das proteínas intracelulares que são sintetizadas em um determinado momento. Dessa maneira, o proteoma da célula é monitorado por linfócitos T citotóxicos (CD8) que reconhecem epítomos de proteínas virais e antígenos tumorais. Já o MHC de classe II é expresso constitutivamente por células especializadas na apresentação de antígenos (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B), e ele proporciona um mecanismo de reconhecimento de epítomos de patógenos extracelulares por linfócitos T auxiliares (CD4) (Neefjes *et al.*, 2011).

Os linfócitos T auxiliares (TH) e regulatórios (Treg) são os principais coordenadores da resposta imune adaptativa em mamíferos. Existem diferentes subconjuntos de células TH que mobilizam um tipo de resposta imune contra diferentes patógenos. As células TH1 direcionam a eliminação de patógenos intracelulares, que infectam células dendríticas e macrófagos, já as células TH2 induzem a expulsão de helmintos intestinais e TH17 promovem resistência a bactérias e fungos extracelulares (Liu *et al.*, 2012).

Em virtude da importância das células TH, foram desenvolvidas ferramentas de bioinformática capazes de identificar e prever os epítomos das células T baseadas na sequência primária do peptídeo e da variação alélica da molécula MHC (Sturniolo *et al.*, 1999; Singh & Raghava, 2001; Yang & Yu, 2009). Em humanos, os genes que codificam as proteínas MHC de classe II – denominados HLA – são polimórficos estão relacionados a rejeição de transplantes. Existem três tipos de genes encontrados no *loci* das moléculas MHC de classe II: HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR. O grupo DR é o mais predominantes e polimórfico, sendo responsável por mais de 90% dos isotipos (Sturniolo *et al.*, 1999; Neefjes *et al.*, 2011).

A interação dos peptídeos antigênicos com a molécula de MHC de classe II foi definida por meio de diferentes técnicas experimentais, como substituições em cada aminoácido do peptídeo antigênico (Jaedetzky *et al.*, 1990; Kariyone *et al.*, 1999), dissociação dos peptídeos ligados à molécula MHC de classe II (Hunt *et al.*, 1992) e, com o avanço da biologia molecular, a técnica *Phage Display* que possibilitou identificar a presença de resíduos que servem como âncoras na ligação ao grupo DR

(Hammer *et al.*, 1993). Além disso, estudos cristalográficos das moléculas de MHC de classe II permitiram identificar, na fenda de ligação ao peptídeo, a presença de aminoácidos altamente polimórficos que, por meio da cadeia lateral, conformam um arranjo tridimensional de cavidades denominadas bolsos. A interação das cadeias laterais do peptídeo ligante com o perfil de bolsos da molécula de MHC de classe II define a especificidade da ligação (Stern *et al.*, 1994).

A análise de Sturniolo e colaboradores (1999) sobre a presença de um perfil de bolsos, nos diferentes alelos do grupo DR, facilitou a construção de um algoritmo preditivo que permite identificar a presença de epítomos que se ligam de forma promiscua aos diferentes alelos. Atualmente, o método de Sturniolo está disponível por meio de um servidor gratuito desenvolvido por Singh e colaboradores (Singh & Raghava, 2011).

1.10.2 Epítomos de linfócitos B

Na PCM, a produção de altos níveis de imunoglobulinas anti-*P. brasiliensis* e sua associação com a imunidade protetora é controversa. Alguns autores associam a imunidade humoral a PCM severa (Juvenale *et al.*, 2001). Porém, estudos recentes, com camundongos deficientes em células B, demonstram a necessidade destas células no controle da doença e demonstram que a transferência passiva de anticorpos confere proteção (Grosso *et al.*, 2003).

A maioria dos epítomos de uma proteína é descontínua e estes epítomos apresentam pequenos segmentos contínuos que se ligam aos anticorpos. Devido às limitações da identificação e síntese dos epítomos descontínuos, os epítomos sintéticos contínuos são utilizados no estudo das propriedades imunológicas das proteínas, diagnóstico de doenças e como candidatos para vacinas sintéticas (Regenmortel, 2001).

Em virtude da importância da imunidade humoral, existem algoritmos bioinformáticos desenvolvidos para prever os epítomos contínuos dos linfócitos B (Saha & Raghava, 2006). Os métodos de predição aplicados utilizam critérios que a definem, como hidrofiliidade (Parker *et al.*, 2006), flexibilidade (Westhof *et al.*, 1984; Karplus & Schulz, 1985), acessibilidade ao solvente (Emeni *et al.*, 1984) e presença de possíveis giros ou voltas na estrutura da proteína (Pellequer *et al.*, 1993).

Atualmente, epítomos contínuos de linfócitos B determinados experimentalmente são armazenados em um banco de dados, denominado BCIPEP, que proporciona

informações como sequência do epítopo, proteína da qual pertence e métodos experimentais utilizados para monitorar o potencial imunogênico do epítopo e grupo patogênico (vírus, bactérias, fungo, etc) (Sha *et al.*, 2005). Utilizando a informação disponível no banco de dados BCIPEP, Saha & colaboradores criaram um algoritmo preditivo para epítomos de linfócitos B, disponibilizado gratuitamente, com 65,93% de precisão (Sha & Raghava, 2006).

1.11 Mapeamento de epítomos

A expressão mapeamento de epítomos se refere à identificação dos epítomos reconhecidos por anticorpos. O método mais adequado para encontrar um epítopo é resolver a estrutura 3D do complexo antígeno-anticorpo por cristalografia de Raios-X ou RNM. Entretanto, a técnica é complexa, depende da obtenção de proteínas altamente purificadas e da formação de cristais de alta qualidade (Gershoni *et al.*, 2007).

Atualmente, o padrão a ser seguido na investigação científica é baseado em técnicas que realizem um monitoramento rápido e replicável, reduzindo as dimensões do ensaio, a quantidade da amostra e os custos. Com o avanço da tecnologia dos microarranjos, foi desenvolvida a técnica de síntese paralela de pequenas sequências do antígeno em uma membrana – denominada *spot* síntese ou método de *spot* – que possibilita avaliar a reação de todos os spots, cada um contendo um determinado epítopo, simultaneamente (Frank, 1992).

O conceito básico do método de *spot* consiste nas reações químicas sobre um suporte sólido (membrana de celulose). Quando cada epítopo é absorvido, em forma de *spot* pela membrana, ocorre a formação de reatores individuais separados fisicamente na superfície. Ao adicionar soluções e reagentes subsequentes é realizada a reação química que pode ser revelada utilizando qualquer método de detecção estabelecido em outras técnicas, como ELISA ou Western Blot, mostrando em cada *spot* uma reação específica que permite identificar epítomos, em um antígeno, que induzem a produção de anticorpos (Frank, 2002)

1.12 Adjuvantes

A função da vacina é promover a indução de uma resposta imune contra o antígeno administrado, sendo capaz de gerar proteção por longo período de tempo contra a infecção. Vacinas baseadas em organismos atenuados não requerem o uso

de adjuvantes, porém proteínas e epítomos são pouco imunogênicos e geralmente requerem associações aos adjuvantes (He & Xiang, 2013). Sendo assim, adjuvantes são substâncias imunopotencializadoras.

A palavra adjuvante é derivada do latim *adjuvare*, significa “para ajudar ou melhorar”, foi criada em 1920 por Gaston Ramon. Ele foi um veterinário do Instituto Pasteur que observou que os cavalos recebiam a toxina da difteria e desenvolviam uma resposta imune mais forte quando tinham alguma inflamação no local da infecção (Ramon, 1924).

O desenvolvimento de vacinas, profiláticas ou terapêuticas, potentes contra doenças causadas por patógenos infecciosos baseia-se na seleção e utilização de adjuvantes adequados.

A utilização de adjuvantes auxilia na formação de uma resposta imune mais intensa e rápida, na liberação progressiva do antígeno no local da injeção, estimulando a produção de citocinas e o recrutamento de células aumentando a absorção e apresentação dos antígenos pelas Células Apresentadoras de Antígenos (APCs), aumentando a expressão de moléculas MHC de classe II e ativando os inflamossomas. Além disso, com a utilização de adjuvantes potentes, menor a quantidade de antígeno será requerida para a estimulação da resposta imune efetiva, reduzindo competição entre antígenos e custos financeiros de suas produções (Audibert, 2003; Awate et al., 2013; Lee et al., 2015; Apostólico et al., 2016).

1.12.1 Quitosana

Descrita em 1859 por Rouget, a quitosana é um biopolímero não tóxico natural constituído por unidades de D-glicosamina em proporções variáveis. A composição química da quitosana é caracterizada pela presença de heteropolissacarídeo policatiônico linear de elevado peso molecular, compreendendo copolímeros de β -1,4-D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina. Ela pode ser obtida a partir da desacetilação da quitina (Figura 6) que é um dos principais componentes das conchas de crustáceos (caranguejo, camarão e lagostas) e da parede celular de fungos do gênero *Zygomyceto* (Kafetzoulou et al., 1993; Carmona-Ribeiro, 2014).

Produzida comercialmente em diferentes países (Japão, países da América do Norte, Polônia, Itália, Rússia, Noruega e Índia), em larga escala, o interesse comercial na quitosana surgiu porque esta apresenta características biológicas únicas com vasta aplicabilidade, sendo biodegradável, biocompatível e não tóxica (Raafat et al.,

2008). Nas últimas décadas, ela tem recebido atenção considerável por ter aplicações na biomedicina, na indústria de alimentos e química. Além disso, a quitosana e seus derivados atraem atenção por atuar como agente antimicrobiano contra fungos, bactérias e vírus, e como indutores de mecanismos de defesas de plantas (Lanranjeira & Favere, 2009; Goy et al., 2009).

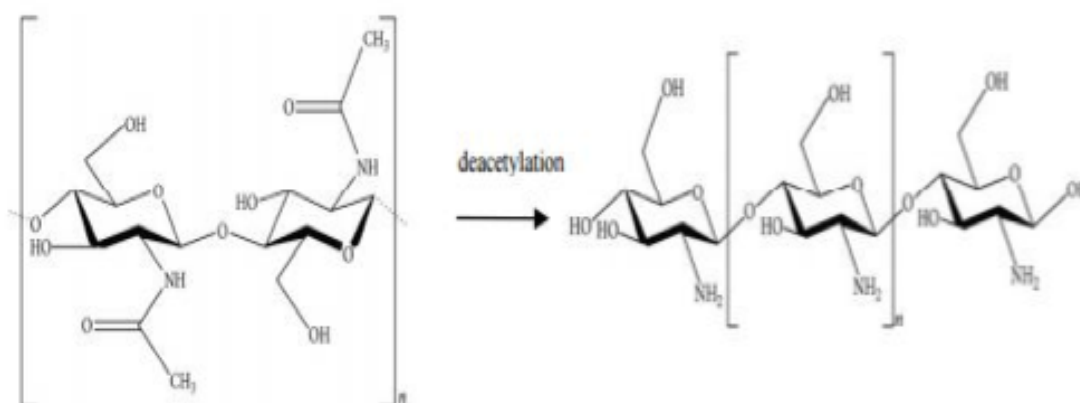


Figura 6: Formação de quitosana a partir da desacetilação de quitina. Fonte: Carmona-Ribeiro, A.M., 2014.

A quitosana provoca inibição do crescimento do fungos *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinérea* e *Candida albicans*. A concentração inibitória mínima referente a quitosana pode ser observada na Tabela 1 (Lanranjeira & Favere, 2009; Goy et al., 2009).

Descrita por ser eficaz na inibição da germinação de esporos, que são o alongamento do tubo germinativo e do crescimento radial, o mecanismo antifúngico da quitosana envolve as suas moléculas com a morfogênese da parede celular interferindo diretamente no crescimento do fungo (Zhu et al., 2007; Goy et al., 2009).

Tabela 1: Concentração inibitória mínima da quitosana contra microrganismos. Concentração normalizada para parte por milhão (ppm). Fonte: Goy et al., 2009, adaptado.

Organismo sensível Gram negativo	MIC (ppm)	Organismo sensível Gram positivo	MIC (ppm)	Organismo sensível Fungos	MIC (ppm)
<i>Escherichia coli</i>	20	<i>Bacillus cereus</i>	<1000	<i>Aspergillus fumigatus</i>	>2000
<i>Xanthomonas campestris</i>	500	<i>Bacillus megaterium</i>	800	<i>Aspergillus parasiticus</i>	>2000
<i>Salmonella entérica</i>	2000	<i>Staphylococcus aureus</i>	20	<i>Fusarium oxysporum</i>	100
<i>Salmonella typhimurium</i>	>1000	<i>Listeria monocytogenes</i>	250	<i>Botrytis cinérea</i>	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>200	<i>Candida lambica</i>	250	<i>Byssochlamys spp</i>	1000-5000
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1000	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<1000	<i>Candida albicans</i>	500
<i>Shigella dysenteriae</i>	>200	<i>Lactobacillus bravis</i>	1000	<i>Drechstera sorokiana</i>	10
<i>Vibrio cholerae</i>	150	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	>1000	<i>Microsporum canis</i>	1100
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	250			<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	250				

Como adjuvante, a quitosana é descrita por aumentar a biodisponibilidade dos antígenos devido a sua propriedade muco adesiva, mecanismo que relaxa junções intercelulares e melhora transporte de antígenos entre células (Lanranjeira & Favere, 2009). Por isso, ela é amplamente aplicada para vias mucosas de administração (oral, nasal, ocular, mucosa) que são rotas não invasivas (Li et al., 2013). O aumento de respostas imunológicas adaptativas por essas vias já foi comprovado (Li et al., 2013; Smith et al., 2014).

Além da propriedade mucoadesiva, melhorar a eficiência das células fagocíticas, induzir fortes respostas imunes sistêmicas contra antígenos (acúmulo e ativação de macrófagos, indução da produção de citocinas) (Lanranjeira & Favere, 2009; Oliveira et al., 2014; Saenz et al., 2009; Zaharoff et al., 2009).

Nanopartículas de quitosana utilizadas como adjuvantes imunológicos em via subcutânea possuem forte potencial para aumentar tanto a resposta imune celular como a humoral como induzir uma resposta de TH1 / TH2 equilibrada (Saenz et al., 2009; Wen et al., 2011). Outra característica imunológica observada no uso da nanopartícula de quitosana como adjuvante é a indução de proliferação de linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8 induzindo respostas antígeno-específicas mais elevadas (Oliveira et al., 2012). Estas características tornam a quitosana uma candidata à adjuvante eficaz e adequada em um amplo espectro de vacinas profiláticas e terapêuticas (Saenz et al., 2009; Wen et al., 2011).

2 JUSTIFICATIVA

A PCM é uma doença endêmica rural e suburbana, prevalente na América Latina e com 80% dos casos descritos no Brasil (Lacaz, 2002). Os tratamentos utilizados contra a PCM apresentam grandes desvantagens como longos períodos medicamentosos, efeitos renais severos e alto índice de recidiva. Mesmo que os pacientes alcancem a cura clínica, estes podem apresentar sequelas, como a fibrose e enfisema pulmonar, sofrendo restrições na qualidade de vida (Brummer *et al.*, 1993; Coutinho *et al.*, 2002; Visbal, 2005). Sendo assim, é necessária a pesquisa por novas terapias com menor efeito colateral, menor duração do tratamento e maior efetividade contra *P. brasiliensis* evitando recidivas e sequelas.

Antígenos de *P. brasiliensis* têm sido utilizados no desenvolvimento de vacinas contra PCM (Diniz *et al.*, 2004), um deles é a proteína recombinante Pb27. Esta proteína tem demonstrado potencial promissor ao induzir resposta imune protetora e reduzir sequelas pulmonares como vacina terapêutica contra *P. brasiliensis* (Reis *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2011b; Moraes *et al.*, 2015).

Com o desenvolvimento das ferramentas de bioinformática, os métodos de seleção de epítomos imunodominantes se tornaram menos dispendiosos na formulação de vacinas que possuem vantagens de maior pureza, maior especificidade de resposta imune, menor resposta imune cruzada, menores efeitos adversos e fácil controle de qualidade e transporte (Sturniolo *et al.*, 1999; Frank, 2002; Saha *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2006).

Além disso, é fundamental a escolha de um adjuvante adequado para o uso associado aos epítomos da Pb27r, não promovendo resposta inflamatória exacerbada como sais de alumínio já descritos em outros trabalhos (Reis *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2011a; Fernandes *et al.*, 2011b). Para a formulação de vacinas terapêuticas é necessário que os adjuvantes sejam biocompatíveis e que promovam a modulação do perfil imunológico protetor contra PCM (He & Xiang, 2013).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade protetora de epítomos imunodominantes da proteína recombinante Pb27 de *P. brasiliensis* associado ao adjuvante nanopartícula de quitosana na paracoccidiodomicose experimental.

3.2 Objetivos específicos

- Predizer epítomos de linfócitos B e T;
- Selecionar epítomos preditos;
- Imunizar camundongos com epítomos selecionados;
- Avaliar Unidade Formadora de Colônia de *P. brasiliensis*;
- Avaliar produção de IgG na resposta imune induzida pelos epítomos selecionados;
- Avaliar índice de sobrevivência dos grupos de animais e
- Caracterizar as nanopartículas de quitosana.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Predição de epítomos

Por meio da sequência da proteína Pb27r (Fernandes et al., 2011b) foi possível realizar a predição de peptídeos utilizando ferramentas de bioinformática.

4.1.1 Epítomos de linfócitos B

Por intermédio do servidor ABCpred foi realizada a predição de epítomos de linfócitos B da Pb27r. ABCpred foi desenvolvido, por Saha e colaboradores (Saha & Raghava, 2006), com base em uma rede neural recorrente utilizando padrões de comprimento fixo a partir de epítomos de células B por eliminação ou adição de resíduos terminais, uma vez que epítomos de células B variam de 5 a 30 resíduos de aminoácidos e pode ser acessado pelo endereço eletrônico <http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/index.html>. O limiar escolhido foi 0.51 e o tamanho foi de 16 aminoácidos por sequência. De acordo com Saha & Raghava (2006), foi alcançada a precisão máxima de 65.93% ao utilizar estes parâmetros selecionados.

4.1.2 Epítomos de linfócitos T

Por meio do servidor Propred foi realizada a predição de peptídeos da Pb27r de ligação ao MHC-II utilizando 51 alelos de HLA-DR disponíveis a partir de um banco de dados descrito por Sturniolo *et al.* (1999) e foram escolhidas as regiões de ligação promíscua, ou seja, peptídeos candidatos na produção de vacinas, utilizando um limiar de 10%. Este servidor foi desenvolvido por Singh e colaboradores (Singh & Raghava, 2001) e pode ser acessado pelo endereço eletrônico <http://www.imtech.res.in/raghava/propred>.

4.2 Síntese de peptídeos na membrana de celulose – Spot síntese

A síntese dos peptídeos preditos em membrana de celulose foi realizada com a colaboração do professor Ricardo Andrez Machado de Avila do departamento de Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e professor Carlos Chavez-Olortegui do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas da UFMG utilizando o método de Laune e colaboradores (2002) adaptado por Machado de Avila (2011).

Os aminoácidos protegidos por um grupamento fluorenil-metil-oxicarbonila (Fmoc) foram previamente ativados por incubação de N,N-diisopropilcarbodiimida (DICP) e Oxyma em N,N-dimetilformamida (DMF). Posteriormente, foi depositado um volume de 6 µL de aminoácidos no sintetizador automático (MultiPep Automatic Spot Synthesizer – Intavis) permitindo a obtenção de aproximadamente 50 nmol de peptídeo por ponto na membrana. Para retirar o grupamento protetor Fmoc associado ao grupamento amino, foi adicionado uma solução de 4-metilpiperidina 25% diluído em DMF. A membrana foi lavada com metanol e, após a secagem, esta foi reposicionada no sintetizador para recomençar o ciclo. Para cada aminoácido foram realizados dois ciclos de acoplamento. Após cada ciclo, a membrana foi lavada com solução de anidrido acético 10% em DMF para impedir a reatividade do grupamento NH₂ que permaneceram livres. Os ciclos se repetiram, da mesma maneira, até o término da síntese total dos peptídeos. Após o término da síntese, os grupamentos protetores de cadeias laterais foram retirados por meio do tratamento da membrana com solução de ácido trifluoracético (TFA) associado a diclorometano 2.5%, trietilililano e água, e as ligações dos peptídeos na membrana de celulose foram mantidas.

4.3 A proteína Pb27r

A proteína recombinante de 27 kDa de *P. brasiliensis* (Pb27r), integrante da fração F0 do antígeno total de *P. brasiliensis* (PbAg), foi cedida pelo professor Alfredo Miranda de Góes do LICM da UFMG e pelo professor Ronaldo Alves Pinto Nagem do Laboratório de Biologia Estrutural (BIOEST) da UFMG.

4.4 Os soros de pacientes com paracoccidioidomicose

Foram utilizados soros de pacientes diagnosticados com PCM procedentes do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias Orestes Diniz (CTR-DIP) do Hospital das Clínicas da UFMG. Os soros adquiridos para teste neste trabalho foram os mesmos utilizados, anteriormente, na pesquisa de doutorado intitulado “Estudo das proteínas Pb40r e Pb27r de *Paracoccidioides brasiliensis* na terapia e no imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose” realizada por Viviane Cristina Fernandes dos Santos de 2007 a 2011.

Os pacientes pertenciam a diferentes grupos como infectado, tratado e recidiva. O tratamento dos pacientes consistiu na administração de anfotericina B durante o

período de internação hospitalar e sulfonamida ou cetoconazol como tratamento de longa duração (Fernandes *et al.*, 2011a). Soros de indivíduos voluntários saudáveis, sem histórico de terem contraído PCM, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG foram chamados de não infectados.

A utilização do material de pacientes para estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) de número ETIC 523/07 (ANEXO). Indivíduos voluntários saudáveis assinaram um termo de consentimento livre antes da coleta do sangue. Tabela de grupos dos soros humanos utilizados:

Tabela 2: Amostras de soros testados por ELISA e Imunoensaio dos peptídeos pontuais na membrana de celulose.

Grupos humanos	Número de amostras
Não infectado (indivíduos saudáveis)	10
Infectado (pacientes com PCM sem medicação)	10
Tratado (pacientes com PCM com medicação)	10
Recidiva (pacientes que voltaram a ter PCM)	5

4.5 ELISA utilizando proteína Pb27r

Os grupos de pool de soros humanos Não infectado, Infectado, Tratado, e Recidiva foram avaliados para verificar a presença anticorpos IgG anti-Pb27r por ELISA e para determinar a diluição do soro que foi utilizada em membrana de celulose contendo peptídeos preditos da Pb27r por meio do imunoensaio de peptídeos.

O ensaio foi realizado utilizando placas de microtitulação de fundo chato (Nunc MaxiSorp Apogent Made in USA) sensibilizadas durante 12 horas a 4°C com 100 µL/poço de tampão carbonato 0.5 M e pH 9.6, contendo 1 µg/poço de Pb27r. Após esta etapa, as placas foram lavadas cinco vezes com o tampão de lavagem PBS-T (Tween-20 0.05% em 0.05 M de PBS, pH7.4), e bloqueadas durante 1 hora com 200 µL/poço da solução de bloqueio (caseína 1.6% em PBS 0.15 M, pH 7.2) a 37°C. Depois de 1 hora de incubação, as placas foram lavadas e incubadas novamente por 1 hora a 37°C com 100 µL/poço do pool de soros dos diferentes grupos nas diluições seriadas de 1:100 até 1:1600 em reagente diluente (caseína 0.25% em PBS 0.05 M, pH 7.4). Após este tempo, as placas foram lavadas e incubadas com 100 µL/poço de anticorpo de feito em cabra anti-IgG de humano conjugado a peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5000 em reagente diluente por 1 hora a 37°C. Novamente as placas

foram lavadas e incubadas com 100 µL/poço de tetrametilbenzidina (TMB, R&D Systems) por 20 minutos em ausência de luz a temperatura ambiente. A revelação foi parada por meio da adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N) e a densidade ótica de 450 nm foi lida em espectrofotômetro (Elx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA).

4.6 Imunoensaio de peptídeos pontuais ligados na membrana de celulose – Imunoensaio de *Spot*

4.6.1 Ligações entre anticorpos e peptídeos na membrana de celulose

A membrana de celulose contendo os peptídeos sintéticos foi lavada com PBS 0.05 M, pH 7.4 , por 3 vezes durante 5 minutos. Na etapa seguinte, foi usada uma solução de bloqueio (albumina sérica bovina – BSA 3% em solução de Tween-20 0.1% e PBS 0.05 M – PBS-T) por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada 1 vez com solução de lavagem (Tween-20 0.1% em PBS 0.05 M – PBS-T) por 10 minutos. Para reação com o soro, a membrana foi incubada com o pool de soros dos grupos Não infectado, Tratado, Recidiva e Infectado na diluição 1:200, anteriormente determinada por meio do ensaio de ELISA, em solução de BSA 1% e PBS-T durante 2 horas. A cada novo ciclo de reação foi utilizado um grupo teste de *pool* de soro. Foram realizadas 3 novas lavagens de 10 minutos antes da revelação. Para a etapa de revelação foi utilizado anticorpo feito em cabra anti-IgG de humano conjugado a fosfatase alcalina (Sigma) na diluição 1:50000 em solução de BSA 1% e PBS-T por 1 hora seguida de 2 lavagens. Após as lavagens, a membrana foi incubada 2 vezes com solução CBS (NaCl 0.8%, KCl 0.02% e ácido cítrico monohidratado 0.21%, pH 7) por 10 minutos para cada incubação. Posteriormente, foi adicionado solução reveladora (20 mL de CBS, 120 µL de MTT 50 mg/mL, 100 µL de BCIP 60 mg/mL, 80 µL MgCl₂ – Sigma) durante 22 minutos na ausência de luz. A revelação dos *spots* foi interrompida realizando 3 lavagens com água Milli-Q de 2 minutos cada, sendo possível visualizar a presença de um precipitado azul sobre os *spots*, ou seja, peptídeos mais reativos. Após a secagem da membrana, esta foi digitalizada a 300 DPI e a intensidade da coloração dos *spots* foi quantificada utilizando o *software ImageJ*.

4.6.2 Regeneração da membrana

Para novos ciclos de revelações posteriores, a membrana foi submetida a um tratamento de regeneração, com objetivo de remover os complexos moleculares precipitados sobre os peptídeos, composto de 3 lavagens de 10 minutos com DMF; 3 lavagens de 10 minutos com reagente A (uréia 8 M, SDS 1%, β -mercaptoetanol 0.1%) e 3 lavagens de 10 minutos com reagente B (etanol, água e ácido acético) nas proporções de 50:40:10 vol/vol/vol. Para facilitar a secagem da membrana, foi realizado 3 lavagens de 10 minutos com metanol e, posteriormente, armazenada em -20°C . Este procedimento de regeneração permite reutilizar a membrana entre 30 e 40 vezes com anticorpos policlonais e até 70 vezes com anticorpos monoclonais. O imunoensaio foi realizado em triplicada para cada grupo de pool de soros (Infectado, Tratado, Recidiva e Não infectado), sob agitação a temperatura ambiente. Para

4.7 Síntese química dos peptídeos solúveis

Os peptídeos selecionados, após a quantificação dos *spots* por meio do *software ImageJ*, foram sintetizados manualmente com a colaboração do professor Ricardo Andrez Machado de Avila do departamento de Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e professor Carlos Chavez-Olortegui do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas da UFMG. Esta síntese manual foi realizada utilizando o método de Merrifield (1969) adaptado por Machado de Avila (2011).

Estes peptídeos foram sintetizados com o objetivo de usa-los como antígeno na vacinação terapêutica e no ensaio de ELISA.

4.8 Polimerização dos peptídeos com glutaraldeído

Os seis peptídeos sintéticos da Pb27r foram solubilizados em água Milli-Q em diferentes concentrações e foram ligados entre si em glutaraldeído 1% (GLUT1%) seguindo o protocolo de Machado de Avila (2004) sem adicionar a proteína carreadora. Para as preparações dos antígenos, ou seja, peptídeos, presentes na formulação vacinal foram adicionados à mesma concentração de cada um destes. O volume final adquirido nesta etapa foi o mesmo volume adicionado de glutaraldeído 1% (proporção 1:1), gota a gota, sob agitação durante 1 hora a 4°C .

Finalizada a reação, os peptídeos da Pb27r foram armazenados em -20°C e posteriormente estes foram utilizados para produzir a formulação vacinal terapêutica juntamente com o adjuvante nanopartículas de quitosana (NpCHO).

4.9 Produção de nanopartículas de quitosana

A produção de nanopartículas de quitosana foi realizado de acordo com Oliveira e colaboradores (2012) adaptado. Foram pesados 250 mg de quitosana (98% desacetilação, Sigma) e solubilizados em 40 mL de ácido acético 1% sob agitação. Posteriormente, foi adicionado 40 mL de tampão acetato 5 mM (362 mL de ácido acético 1M, 1.75 g de acetato de sódio, 50 mL de água deionizada, solução diluída 10 vezes) pH 5.5. Posteriormente o volume da solução foi completado para 100 mL com tampão acetato.

Na etapa seguinte, as soluções quitosana 0.25% e sulfato de sódio 5% foram aquecidas a 55°C e mantidas nesta temperatura durante 10 minutos. Em seguida, a solução sulfato de sódio 5% foi gotejada sobre a solução quitosana 0.25% sob agitação. Ao final deste processo, foi obtido uma mistura de cor branca ou turva. A solução foi mantida em agitação durante 12 horas e a coloração se tornou mais acentuada. Após este período, a solução foi distribuída em tubos que por sua vez foram centrifugados a 5000 RPM (Centrifuge Z 36 HK – Hermle) em 18°C durante 20 minutos. Para cada 15 mL de solução centrifugada, 1 mL da suspensão foi mantida para ressuspender o *pellet* (NpCHO) presente no tubo com auxílio do vórtex durante 1 minuto.

4.10 Caracterização das nanopartículas de quitosana

4.10.1 Espalhamento de Luz Dinâmico e potencial Zeta

O Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e o potencial Zeta das NpCHOs foi mensurado com as colaborações do Davyston Carvalho Pedersoli e professora Rosana Zacarias Domingues do Laboratório de Materiais e Pilhas a Combustível (LaMPaC) do Departamento de Química da UFMG. A suspensão de NpCHO foi diluída 200 vezes em água Milli-Q, usando o volume final de 1 mL na cubeta de poliestireno do z-sizer. A avaliação de tamanho médio das NpCHOs mensurado pelo diâmetro hidrodinâmico médio por meio do DLS e a avaliação da carga superficial da NpCHO, para avaliar se há carga disponível para ligação com outros compostos, por

meio do potencial Zeta, foi realizada seguindo o protocolo do fabricante Malvern utilizando o próprio equipamento Z-sizer nano series – Nano Z590.

4.10.2 Microscopia eletrônica de transmissão – MET

Para preparar as NpCHOs, no Centro de Microscopia da UFMG, a suspensão foi submetida ao sonificador por 1 minuto a fim de melhorar a dispersão das partículas e evitar a aglomeração. Em seguida, a suspensão foi gotejada sob uma grade de cobre coberta com carbono, secada e tratada com acetato de uranila 2%.

Para visualizar e analisar o tamanho das NpCHOs, as imagens foram realizadas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-20 – SuperTwin FEI – 200 kV do Centro de Microscopia da UFMG.

4.11 Adsorção de peptídeos da Pb27r nas nanopartículas de quitosana

A adsorção dos diferentes peptídeos nas NpCHO é realizado por meio da interação iônica entre os grupamentos amino da NpCHO e os grupamentos carboxila dos peptídeos (Borges *et al.*, 2005). Os peptídeos foram solubilizados na solução de NpCHO e deixados a 300 rpm, 18°C durante 2 horas. O protocolo foi realizado para peptídeos soltos (sem GLUT 1%) e peptídeos ligados (com GLUT 1%).

A formulação da vacina terapêutica foi 50 µg/100 µL para cada BALB/c, ou seja, 50 µg dos diferentes peptídeos ligados ou soltos em 100 µL de NpCHO por BALB/c. Para a formulação vacinal, foi utilizada a mesma concentração de cada peptídeo para compor a concentração final de 50 µg/animal. Este procedimento é a produção final da vacina terapêutica que é preparada no mesmo dia de aplicação no modelo animal em estudo nesta pesquisa.

4.12 Cultura de *P. brasiliensis*

A cepa Pb18 de *P. brasiliensis* utilizada na infecção experimental foi cedida pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A conservação desta cepa foi realizada por meio de sementes semanais em meio de cultura YPD sólido feito a partir de 5 g/L de extrato de levedura (Acumedia), 5 g/L de peptona de carne (Acumedia), 15 g/L de D-glucose (Synth) e 15 g/L de ágar (Difco). As culturas foram mantidas a 37° C na forma de levedura. O fungo foi transferido, uma vez ao mês, para

os pulmões de camundongos BALB/c machos a fim de promover a manutenção da virulência da cepa antes da infecção experimental deste trabalho.

4.13 Paracoccidioidomicose experimental

4.13.1 Infecção intratraqueal

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram suspendidas em PBS 0.15 M estéril e contadas utilizando o corante verde Janus para verificar a viabilidade. Somente as preparações com viabilidade celular superior a 90% foram utilizadas. Camundongos BALB/c machos, entre 6 e 8 semanas de idade, foram anestesiados com solução de cloridrato de xilazina 43% (Anasedan injetável – Ceva, SP) e cloridrato de cetamina 53% (Dopalen injetável – Ceva, SP) da qual foi aplicado o volume de 40 µL/animal. Posteriormente, no pescoço, foi realizado um corte da região central superior expondo a traquéia e possibilitando a inoculação de 50 µL contendo 3×10^5 células leveduriformes por animal. O corte foi suturado com fio de nylon e limpado com solução tópica de iodopovidona 10% (PVPI).

Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comissão Ética no Uso de Animais – UFMG (CEUA), sob o protocolo número: 359/2012 (ANEXO).

4.13.2 Vacinação terapêutica

Grupos de camundongos BALB/c foram submetidos à vacinação terapêutica pela via subcutânea, de acordo com a Tabela 3, 15 dias após infecção com *P. brasiliensis*. Os grupos experimentais tiveram o tratamento de 1 vacina/semana durante 5 semanas, ou seja, os animais foram vacinados 5 vezes antes dos pontos de eutanásia. Cada grupo experimental teve um n amostral de 8 camundongos.

Tabela 3: Grupos experimentais e composição da vacina terapêutica.

Grupos	Composição por animal
Controle negativo (CN)	Sem intervenção
Controle positivo (CP)	Infectados com cepa Pb18 leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>
Nanopartícula de quitosana (NpCHO)	100 µL de NpCHO
Peptídeo solto (PEP SOL)	50 µg de diferentes peptídeos sem GLUT 1%

Peptídeo ligado (PEP LIG)	50 µg de diferentes peptídeos com GLUT1%
Nanopartícula de quitosana e Peptídeo solto (NpCHO PEP SOL)	50 µg de diferentes peptídeos sem GLUT1% em 100 µL de NpCHO
Nanopartícula de quitosana e Peptídeo ligado (NpCHO PEP LIG)	50 µg de diferentes peptídeos com GLUT1% em 100 µL de NpCHO
Nanopartícula de quitosana e Pb27r solto (NpCHO Pb27r SOL)	50 µg de Pb27r sem GLUT1% em 100 µL de NpCHO
Nanopartícula de quitosana e Pb27r ligado (NpCHO Pb27r LIG)	50 µg de Pb27r sem GLUT1% em 100 µL de NpCHO

4.13.3 Pontos de eutanásia

Os grupos de BALB/c foram anestesiados, da mesma maneira realizada na etapa de infecção intratraqueal, e submetidos eutanásia 49 e 56 dias após a infecção por meio do deslocamento cervical. Foram coletadas alíquotas de sangue de cada grupo, processadas a 3000 RPM (Centrifuge 5415 R – Eppendorf), durante 10 minutos, a temperatura ambiente e o soro obtido foi utilizado para realizar ensaio de ELISA de peptídeo. Para cada ponto de eutanásia, foram utilizados 4 animais e cada pulmão adquirido, sob esterilidade, foi dividido para determinação de unidades formadoras de colônias (UFCs) e produção de cortes histológicos.

4.13.4 Curva de Sobrevivência

Os animais foram monitorados durante os 56 dias após a infecção desafio. As curvas de sobrevivência foram realizadas utilizando o método de Kaplan-Meier.

4.14 Ensaios de proteção

4.14.1 Unidades formadoras de colônias

O pulmão de cada animal dos pontos de eutanásia foi utilizado em triplicata para determinação das UFCs. Para isso, o pulmão foi pesado e macerado em 1 mL de PBS 0.15 M. Posteriormente, sob esterilidade, uma alíquota de 100 µL do órgão macerado foi semeada em placa contendo meio infusão de cérebro e coração (BHI, Difco) suplementado com SFB 4% (Cripion), sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* 5% e 10 µg/mL de gentamicina. Em seguida, as placas foram incubadas

a 37°C e as UFCs foram contadas no 20º dia de incubação. Os resultados foram expressos como Log₁₀ da média do número de UFCs por grama de tecido (pulmão).

4.14.2 ELISA utilizando peptídeos da Pb27r

O *pool* de soros dos grupos de BALB/c CN, CP, NpCHO, PEP SOL, PEP LIG, NpCHO PEP SOL, NpCHO PEP LIG, NpCHO Pb27r SOL, NpCHO Pb27r LIG foram avaliados para verificar a presença IgGs anti-peptídeos da Pb27r. O reconhecimento de peptídeo foi testado de 2 maneiras diferentes: sensibilizando a placa com *pool* peptídeos soltos e sensibilizando a placa com somente um tipo de peptídeo por vez para avaliar qual foi o peptídeo mais reativo frente aos grupos de soros.

O ensaio foi realizado utilizando placas de microtitulação de fundo chato (Nunc MaxiSorp Apogent Made in USA) sensibilizadas durante 48 horas a temperatura ambiente com 50 µL/poço de tampão carbonato 0.5 M pH 9.6, contendo 5 µg/poço. Após esta etapa, as placas foram bloqueadas durante 1 hora com 200 µL/poço da solução de bloqueio (caseína 1.6% em PBS 0.15 M, pH 7.2) a 37°C. Depois as placas foram incubadas novamente por 1 hora a 37°C com 100 µL/poço do *pool* de soros dos diferentes grupos na diluição 1:50 em reagente diluente (caseína 0.25% em PBS 0.05 M, pH 7.4). Após este tempo, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (Tween-20 0.05% em 0.05 M de PBS, pH7.4) e incubadas com 100 µL/poço de anticorpo secundário feito em cabra anti-IgG ou anti-IgG1 ou anti-IgG2a ou anti-IgG2b ou anti-IgG3 de mouse conjugado a peroxidase (Sigma) na diluição de 1:1000 em reagente diluente por 1 hora a 37°C. Novamente as placas foram lavadas e incubadas com 100 µL/poço de tetrametilbenzidina (TMB, R&D Systems) por 20 minutos em ausência de luz a temperatura ambiente. A revelação foi parada por meio da adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N) e a densidade ótica de 450 nm foi lida em espectrofotômetro (Multiskan Go – Thermo Scientific).

4.14.3 Histologia

4.14.3.1 Hematoxilina-Eosina

O pulmão de cada animal dos pontos de eutanásia foi fixado em solução de formaldeído 4% e após 24 horas, os pulmões foram colocados em cassetes histológicos e embebidos em etanol 100%. A coloração de tecidos hematoxilina-eosina (HE) foi realizada em colaboração com Diego Carlos dos Reis e seu orientador professor Geovanni Dantas Cassali do Laboratório de Patologia Comparada do

departamento de Patologia Geral da UFMG. Posteriormente, as lâminas foram analisadas e fotodocumentadas por meio do *software* ZEN em microscópio ótico (Primo Star Zeiss). Esta coloração foi realizada a fim de avaliar a morfologia do pulmão dos diferentes grupos experimentais em relação a formação de granulomas e infiltrados inflamatórios.

4.14.3.2 *Tricômico de gomori*

O pulmão de cada animal dos pontos de eutanásia foi fixado em solução de formaldeído 4% e após 24 horas, os pulmões foram colocados em cassetes histológicos e embebidos em etanol 100%. A coloração de tecidos gomori foi realizada em colaboração com Diego Carlos dos Reis e seu orientador professor Geovanni Dantas Cassali do Laboratório de Patologia Comparada do departamento de Patologia Geral da UFMG. Posteriormente, as lâminas foram analisadas e fotodocumentadas por meio do *software* ZEN em microscópio ótico (Primo Star Zeiss). Esta coloração foi realizada a fim de visualizar o colágeno (coloração verde) depositado ao redor do fungo.

4.15 Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) *One-way* com pós teste Bonferroni utilizando o *software Prism 5.0* (GraphPad, CA – USA). Para o resultado do imunoensaio de peptídeos em spot utilizando soros humanos, a linha de corte (*cut-off*) foi calculada com a fórmula $2 \times \text{desvio padrão} + \text{média do controle negativo}$.

5 RESULTADOS

5.1 Predição de epítomos da proteína Pb27r

5.1.2 Linfócito B

A predição dos epítomos de linfócitos B realizada por meio do servidor ABCpred utilizando um limiar de 0.51 e 16 aminoácidos por sequência peptídica. Foram encontrados 20 epítomos de linfócitos B com score a partir de 0.52, como demonstrados na Tabela 4. Peptídeos de maior score possuem maior probabilidade de serem epítomos em sistema *in vivo*.

Tabela 4: Localização dos 20 epítomos (posição inicial) na sequência da Pb27r, sequência de aminoácidos dos epítomos e pontuação de cada epítomo.

Posição inicial	Sequência	Score
84	GHTIPAYKLRRPGGTV	0.94
161	GTDIRDIIISMIPLAVP	0.88
57	HRKITADNLTTQLLKS	0.85
36	CLLSGDPNRRTEDVDL	0.85
152	YQRQGSRKEGTDIRDI	0.84
168	ISMIPLAVPGKPELNF	0.82
104	ELEV DYQSWPQRPQYD	0.82
46	TEDVDLVIHVDHRKIT	0.78
21	DSL NIDYAIMGGAATC	0.78
120	LQTATRTTLNINGQKV	0.77
78	EGVSQFGHTIPAYKLR	0.74
72	SFPSDFEGVSQFGHTI	0.68
195	NLVQKR PDLSSALKAK	0.66
96	GGTVQLVVELEV DYQS	0.63
186	SQELQTALANLVQKRP	0.62
137	LFSPEWILREKILSQY	0.56
204	SSALKAKIKCSAVFHN	0.55
90	YKLRRPGGTVQLVVEL	0.53
11	TVVSVLAQKLD SLNID	0.53
3	RALSSELKTVVSVLAQ	0.52

5.1.3 Linfócito T

A predição de epítomos de linfócitos T realizada por meio do servidor Proped foi analisada para os 51 alelos de HLA-DR disponíveis e para um de limiar de 10%. Foram encontrados 116 epítomos promíscuos, com resíduos de aminoácidos variáveis, capazes de se ligar a vários alelos de HLA-DR. Epítomos demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5: Localização dos 55 epítomos (posição inicial) na sequência da Pb27r e sequência de aminoácidos dos epítomos.

Sequência	Sequência	Sequência
GHTIPAYKLRRPGG	SFPSDFEGVSQFGH	RQGSRKEGTDIRDIIIS
TV	TI	
GTDIRDIIISMIPLAVP	EVDYQSWPQRPQY	QKVKLFSP EWILREKI
	DLQ	
HRKITADNLTQLLK	KITADNLTQLLKSF	QYDLQTATRTTLNING
S	P	
CLLSGDPNRRTEDV	AATCLLSGDPNRRRT	TVVSVLAQKLD SLNID
DL	ED	
YQRQGSRKEGTDIR	AIMGGAATCLLSGD	RALSSELKTVVSVLAQ
DI	PN	
ISMIPLAVPGKPELN	NLVQKRPDLSSALK	LNFNQSQELQTALANL
F	AK	
ELEV DYQSWPQRP	HTIPAYKLRRPGGTV	IISMIPLAVPGKPELN
QYD	Q	
TEDVDLVIHVDHRKI	IHVDHRKITADNLT	MIPLAVPGKPELN FNQ
T	Q	
DSL NIDYAIMGGAA	QKRPDLSSALKAKIK	RKEGTDIRDIIISMIPL
TC	C	
LQTATRTTLNINGQ	IRDIISMIPLAVPGKP	MARALSSELKTVVSVLA
KV		
EGVSQFGHTIPAYK	REKILSQYQRQGSR	MARALSSELKTVVSVLA
LR	KE	QKL

SFPSDFEGVSQFG	RPQYDLQTATRRTL	VVSVLAQKLDLNI
HTI	NI	MG
NLVQKRPDLSSALK	GGTVQLVVELEV	LNIDYAIMGGAAT
AK	QS	
GGTVQLVVELEV	GVSQFGHTIPAYKLR	LNIDYAIMGGAATCLL
QS	R	
SQELQTALANLVQK	TQLLKSFPSDFEGVS	IHVDHRKITADNLTTQ
RP	Q	
ALSSDELKTVVSVL	ILSQYQRQGSRKEG	LVIHVDHRKITADNLTTQ
AQ	TD	
LFSPWILREKILSQ	TVQLVVELEV	IHVDHRKITADNLTTQ
Y	WP	
SSALKAKIKCSAVFH	LSGDPNRRTEDVDL	ITADNLTTQLLKSFPSDF
N	VI	
YKLRRPGGTVQLVV	SQELQTALANLVQK	ITADNLTTQLLKSFPSDF
EL	RP	E
TVVSVLAQKLDLNI	QGSRKEGTDIRDIIS	FEGVSQFGHTIPAYK
D	M	
GHTIPAYKLRRPGG	FGHTIPAYKLRRPGG	FEGVSQFGHTIPAYKLR
TV	T	RPGGT
GTDIRDIISMIPLAVP	VVELEV	FGHTIPAYKLRRPGGT
	PQ	
HRKITADNLTTQLLK	DFEGVSQFGHTIPAY	YKLRRPGGTVQLVVELE
S	K	V
CLLSGDPNRRTEDV	KILSQYQRQGSRKE	YKLRRPGGTVQLVVELE
DL	GT	VDYQ
RDIISMIPLAVPGKP	WPQRPQYDLQTATR	VVELEV
E	TT	QSWPQRPQ
YQRQGSRKEGTDIR	MGGAATCLLSGDPN	VQLVVELEV
DI	RR	QSWPQ
ISMIPLAVPGKPELN	QSWPQRPQYDLQT	INGQKVKLFSPEWI
F	ATR	

ELEV DYQSWPQRP	SQFGHTIPAYKLRRP	INGQKV KLF SPEWILREK
QYD	G	ILS
SRKEGTDIRDIISMIP	PSDFEGVSQFGHTIP	INGQKV KLF SPEWILREK
	A	ILSQ
TEDVDLVIHVDHRKI	RPDLSSALKAKIKCS	LNINGQKV KLF SPEWI
T	A	
DSL NIDYAIMGGAA	GSRKEGTDIRDIISMI	VKLF SPEWILREKILSQY
TC		QRQGS
YQSWPQRPQYDLQ	PNRRTEDVDLVIHVD	VKLF SPEWILREKILSQ
TAT	H	
VDYQSWPQRPQYD	LAVPGKPELNFNQS	VKLF SPEWILREKILSQY
LQT	QE	QRQG
LQTATRTTLNINGQ	LF SPEWILREKILSQ	VKLF SPEWILREKILS
KV	Y	
TATRTTLNINGQKV	IPAYKLRRPGGT VQL	WILREKILSQYQRQGS
KL	V	
YDLQTATRTTLNIN	QLLSFSPDFEGVS	WILREKILSQYQRQGSR
GQ	QF	KE
EGVSQFGHTIPAYK	LVIHVDHRKITADNLT	ILREKILSQYQRQGS
LR		
DVDLVIHVDHRKITA	RRTEDVDLVIHVDHR	ILREKILSQYQRQGSRK
D	K	E
TIPAYKLRRPGGT V	SGDPNRRTEDVDLVI	RDIISMIPLAVPGK
QL	H	
GGAATCLLSGDPN	SSALKAKIKCSAVFH	LNFNQSQELQTALANLV
RRT	N	
SLNIDYAIMGGAAT	NQSQELQTALANLV	LQTALANLVQKR PDLSS
CL	QK	
LSQYQRQGSRKEG	SPEWILREKILSQYQ	VQKR PDLSSALKAKIKC
TDI	R	SA
TCLLSGDPNRRTED	KLF SPEWILREKILS	LVQKR PDLSSALKAKIKC
VD	Q	SA

PQRPQYDLQTATRT	EGTDIRDIISMIPLAV	LKAKIKCSAVFHN
TL		
PLAVPGKPELNFNQ	YKLRRPGGTVQLVV	
SQ	EL	
VDLVIHVDHRKITAD	IMGGAATCLLSGDP	
N	NR	

5.2 Seleção de soros humanos reativos à ELISA utilizando Pb27r e soros humanos

A reatividade dos soros de pacientes com PCM e soro de indivíduos saudáveis frente à Pb27r foram comparados e testados em diferentes diluições. Ao utilizar soro Infectado e soro Não infectado foi observada a reatividade entre eles (figura 7a). Ao utilizar soros Infectado, Tratado, Recidiva e Não infectado foi determinada a diluição 1:200, devido a discriminação obtida entre eles diminuindo a possibilidade de reação inespecífica no imunoensaio de peptídeos na membrana de celulose (figura 7b).

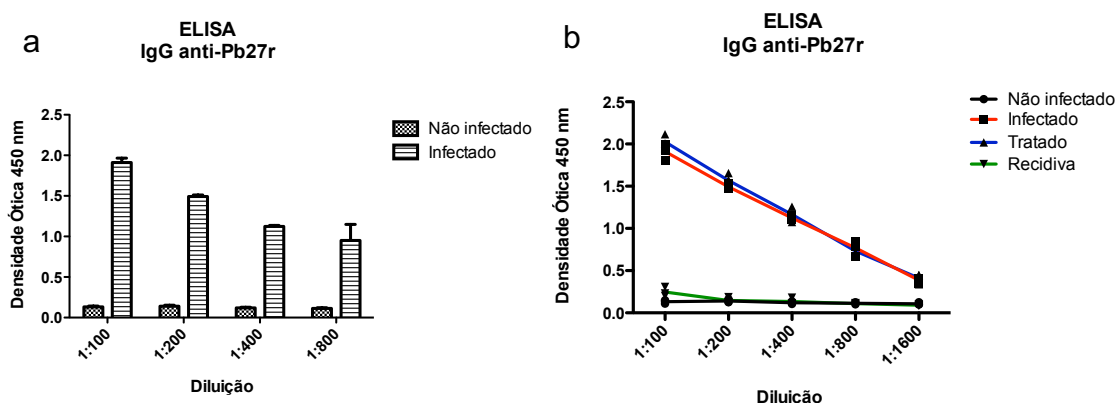


Figura 7: Detecção de anticorpos anti-Pb27r em pacientes com PCM. (a) Níveis de IgG anti-Pb27r em grupos Não infectado e Infectado nas diluições 1:100, 1:200, 1:400, 1:800. (b) Níveis de IgG anti-Pb27r em grupos Não infectado, Infectado, Tratado e Recidiva nas diluições 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600.

5.3 Seleção de peptídeos por imunoensaio em membra de celulose

Os 136 epítomos preditos de linfócitos B e T sintetizados em membrana de celulose por meio do método de *Spot* (Figura 8.1) e testados frente aos grupos de *pool* de soros humanos Infectados, Tratados, Recidiva e Não infectado foram mensurados por densitometria no *software ImageJ*. Os 6 peptídeos estão demonstrados em gráfico

após a densitometria (Figura 8.2) e ressaltados em círculos (Figura 8.3) para visualização em membrana.

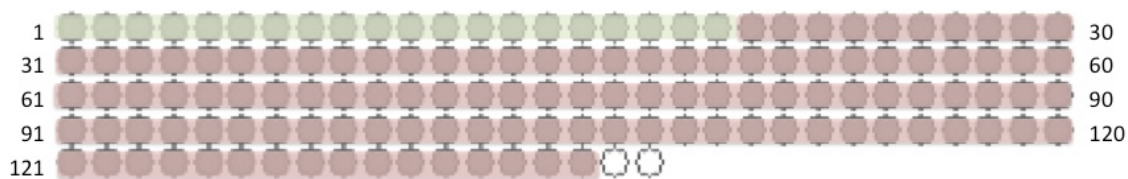


Figura 8.1: Disposição dos 136 epítomos preditos em membrana de celulose, sendo 20 epítomos preditos de linfócitos B (cor verde) e 116 epítomos preditos de linfócitos T (cor rosa).

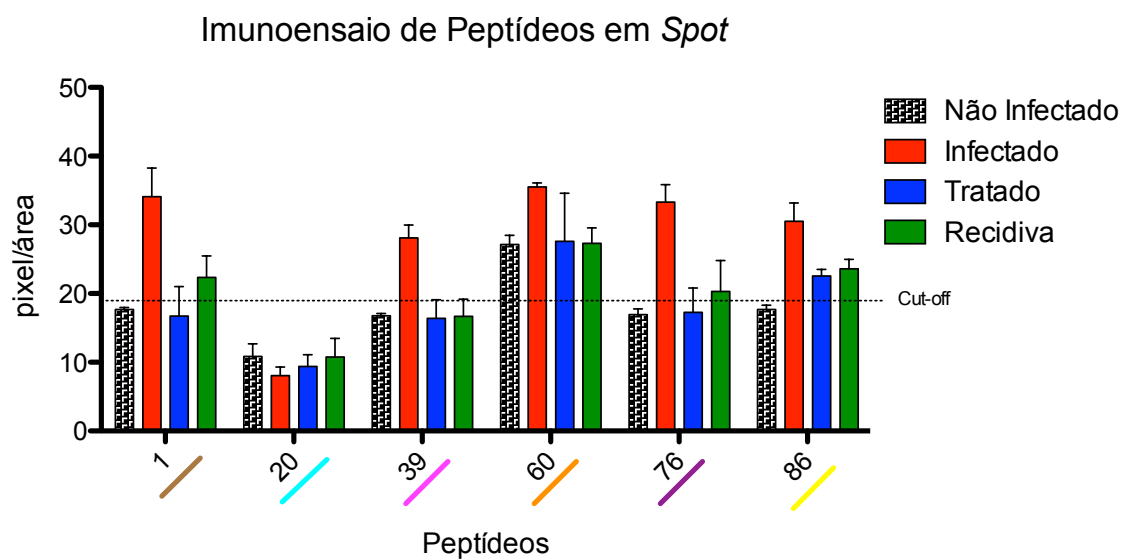


Figura 8.2: 6 peptídeos selecionados e demonstrado em gráfico frente aos diferentes grupos de soros humanos Não infectado, Infectado, Tratado e Recidiva, representados em barras.

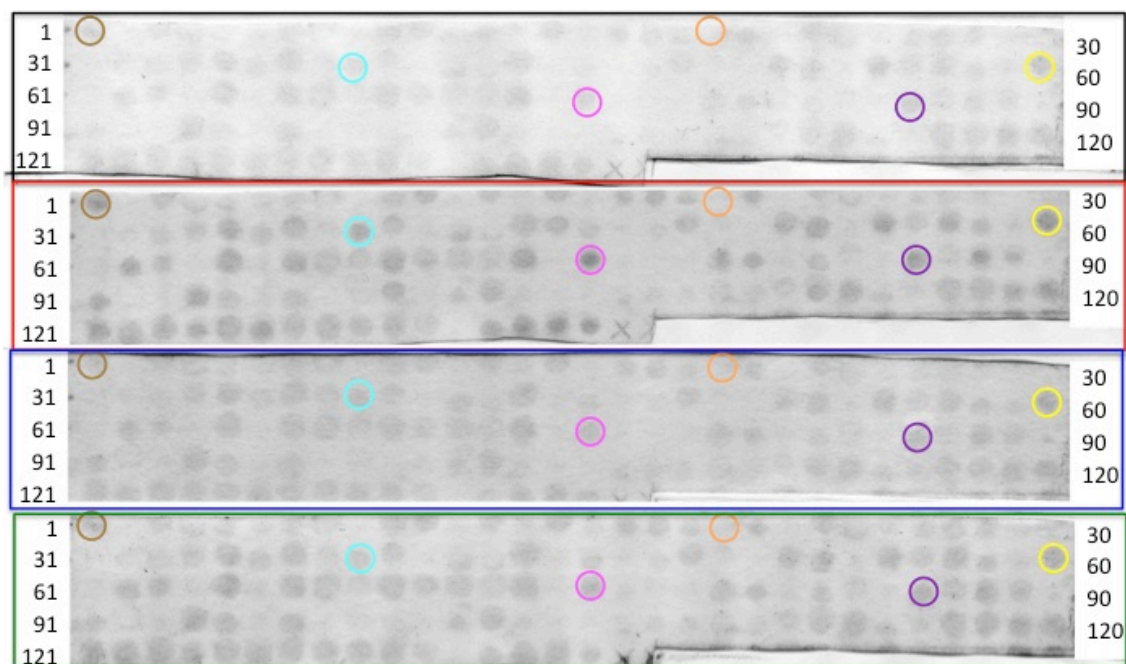


Figura 8.3: 6 peptídeos selecionados e ressaltados sobre a membrana de celulose frente aos grupos de soros humanos nas mesmas cores da figura 8.2 frente aos diferentes grupos de soros humanos Não infectado, Infectado, Tratado e Recidiva, respectivamente representados em cada membrana de celulose.

Cada *spot* representa uma sequência de aminoácidos na membrana que são os epítomos preditos de linfócito B ou T. A sequência de epítomos selecionados por meio do imunoensaio em *spot* estão demonstrados na Tabela 6. Os epítomos do spot 1 e 21, 20 e 96 são iguais e preditos por linfócitos B e linfócitos T.

Tabela 6: Sequência de epítomos de linfócitos B e T selecionados e ressaltados. Os *spots* de 1 a 20, ou seja, de linfócitos B, na membrana de celulose, estão representados por suas sequências de aminoácidos. Os *spots* 21 a 136, ou seja, de linfócitos T também estão representados por suas sequências de aminoácidos. As sequências ressaltadas são os epítomos selecionados para a produção da vacina terapêutica.

Spot	Sequência	Spot	Sequência
1	<u>GHTIPAYKLRRPGGTV</u>	69	DFEGVSQFGHTIPAYK
2	GTDIRDIIISMIPLAVP	70	KILSQYQRQGSRKEGT
3	HRKITADNLTTQLLKS	71	WPQRPQYDLQTATRTT
4	CLLSGDPNRRRTEDVDL	72	MGGAATCLLSGDPNRR
5	YQRQGSRKEGTDIRDI	73	QSWPQRPQYDLQTATR
6	ISMIPLAVPGKPELNF	74	SQFGHTIPAYKLRRPG

7	ELEVDYQSWPQRPQYD	75	PSDFEGVSQFGHTIPA
8	TEDVDLVIHVDHRKIT	76	<u>RPDLSSALKAKIKCSA</u>
9	DSLNIIDYAIMGGAATC	77	GSRKEGTDIRDIISMI
10	LQTATRRTLNINGQKV	78	PNRRTEDVDLVIHVDH
11	EGVSQFGHTIPAYKLR	79	LAVPGKPELNFNQSQE
12	SFSPDFEGVSQFGHTI	80	LFSPWILREKILSQY
13	NLVQKRPDLSSALKAK	81	IPAYKLRRPGGTVQLV
14	GGTVQLVVELEVDYQS	82	QLLSFSPDFEGVSQF
15	SQELQTALANLVQKRP	83	LVIHVDHRKITADNLT
16	ALSSDELKTVVSVLAQ	84	RRTEDVDLVIHVDHRK
17	LFSPWILREKILSQY	85	SGDPNRRTEDVDLVIH
18	SSALKAKIKCSAVFHN	86	<u>SSALKAKIKCSAVFHN</u>
19	YKLRRPGGTVQLVVEL	87	NQSQELQTALANLVQK
20	<u>TVVSVLAQKLDLNLID</u>	88	SPEWILREKILSQYQR
21	<u>GHTIPAYKLRRPGGTV</u>	89	KLFSPWILREKILSQ
22	GTDIRDIISMIPLAVP	90	EGTDIRDIISMIPLAV
23	HRKITADNLTTQLLS	91	YKLRRPGGTVQLVVEL
24	CLLSGDPNRRTEDVDL	92	IMGGAATCLLSGDPNR
25	RDIISMIPLAVPGKPE	93	RQGSRKEGTDIRDIIS
26	YQRQGSRKEGTDIRDI	94	QKVKLFSPEWILREKI
27	ISMIPLAVPGKPELNF	95	QYDLQTATRRTLNING
28	ELEVDYQSWPQRPQYD	96	<u>TVVSVLAQKLDLNLID</u>
29	SRKEGTDIRDIISMIP	97	RALSSELKTVVSVLAQ
30	TEDVDLVIHVDHRKIT	98	LNFNQSQELQTALANL
31	DSLNIIDYAIMGGAATC	99	IISMIPLAVPGKPELN
32	YQSWPQRPQYDLQTAT	100	MIPLAVPGKPELNFNQ
33	VDYQSWPQRPQYDLQT	101	RKEGTDIRDIISMIPL
34	LQTATRRTLNINGQKV	102	MARALSSELKTVVSVLA
35	TATRRTLNINGQKVKL	103	MARALSSELKTVVSVLAQKL
36	YDLQTATRRTLNINGQ	104	VVSVLAQKLDLNLIDYAIMG
37	EGVSQFGHTIPAYKLR	105	LNIDYAIMGGAAT
38	DVDLVIHVDHRKITAD	106	LNIDYAIMGGAATCLL
39	<u>TIPAYKLRRPGGTVQL</u>	107	IHVDHRKITADNLTTQ

40	GGAATCLLSGDPNRRT	108	LVIHVDHRKITADNLTTQ
41	SLNIDYAIMGGAATCL	109	IHVDHRKITADNLTTQ
42	LSQYQRQGSRKEGTDI	110	ITADNLTTQLLKSFPSPDF
43	TCLLSGDPNRRTEDVD	111	ITADNLTTQLLKSFPSPDFE
44	PQRPQYDLQTATRTTL	112	FEGVSQFGHTIPAYK
45	PLAVPGKPELNFNQSQ	113	FEGVSQFGHTIPAYKLRRPGGT
46	VDLVIHVDHRKITADN	114	FGHTIPAYKLRRPGGT
47	SFPSPDFEGVSQFGHTI	115	YKLRRPGGTVQLVVELEV
48	EVDYQSWPQRPQYDLQ	116	YKLRRPGGTVQLVVELEV DYQ
49	KITADNLTTQLLKSFP	117	VVELEV DYQSWPQRPQ
50	AATCLLSGDPNRRTED	118	VQLVVELEV DYQSWPQRPQ
51	AIMGGAATCLLSGDPN	119	INGQKVKLFSPEWI
52	NLVQKRPDLSSALKAK	120	INGQKVKLFSPEWILREKILS
53	HTIPAYKLRRPGGT VQ	121	INGQKVKLFSPEWILREKILSQ
54	IHVDHRKITADNLTTQ	122	LNINGQKVKLFSPEWI
55	QKRPDLSSALKAKIKC	123	VKLFSPEWILREKILSQYQRQGS
56	IRDIISMIPLAVPGKP	124	VKLFSPEWILREKILSQ
57	REKILSQYQRQGSRKE	125	VKLFSPEWILREKILSQYQRQG
58	RPQYDLQTATRTTLNI	126	VKLFSPEWILREKILS
59	GGTVQLVVELEV DYQS	127	WILREKILSQYQRQGS
60	<u>GVSQFGHTIPAYKLRR</u>	128	WILREKILSQYQRQGSRKE
61	TQLLKSFPSPDFEGVSQ	129	ILREKILSQYQRQGS
62	ILSQYQRQGSRKEGTD	130	ILREKILSQYQRQGSRKE
63	TVQLVVELEV DYQSWP	131	RDIISMIPLAVPGK
64	LSGDPNRRTEDVDLVI	132	LNFNQSQELQTALANLV
65	SQELQTALANLVQKRP	133	LQTALANLVQKRPDLSS
66	QGSRKEGTDIRDIISM	134	VQKRPDLSSALKAKIKCSA
67	FGHTIPAYKLRRPGGT	135	LVQKRPDLSSALKAKIKCSA
68	VVELEV DYQSWPQRPQ	136	LKAKIKCSAVFHN

Além dos 6 peptídeos selecionados para produção de vacina, outros 7 peptídeos foram reativos frente aos grupos de soros humanos (Figura 8.4). Demonstrando eficiência no reconhecimento dos anticorpos, provenientes dos

pacientes com PCM, aos epítomos preditos. Exceto o epítomo 60, pois o soro Não infectado foi detectado acima do *cut-off*.

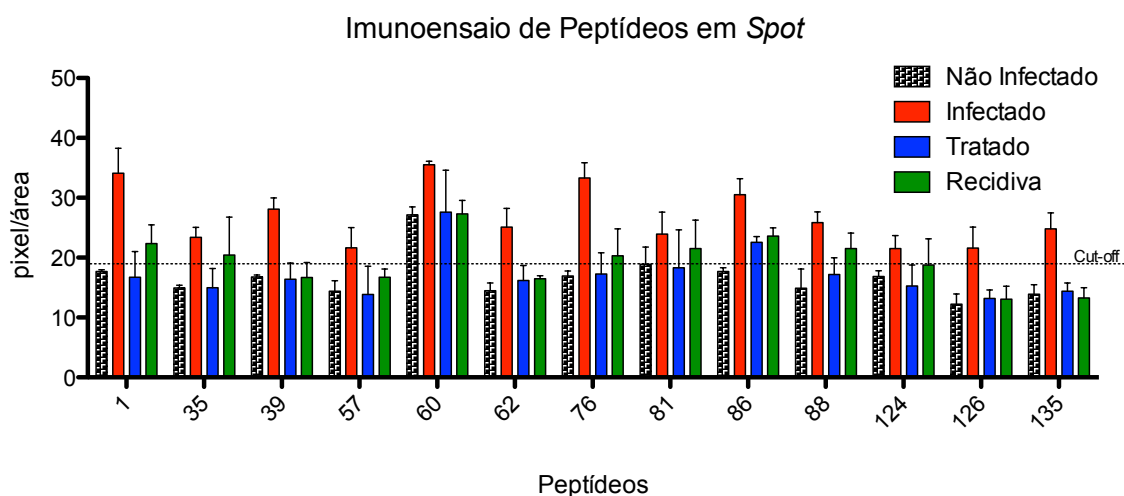


Figura 8.4: 13 epítomos reativos aos soros de pacientes com PCM. O epítomo 60 apresentou reatividade também aos anticorpos do soro Não infectado.

5.4 Caracterização das nanopartículas de quitosana

Durante a caracterização da amostra a 25°C, foi observado a viscosidade da água MilliQ a 0,8881 cP e o índice de refração da água MilliQ e da suspensão de NpCHO a 1,330.

5.4.1 Potencial Zeta e Espalhamento de Luz Dinâmico da NpCHO

O potencial Zeta mostra a estabilidade das NpCHOs por meio da carga de repulsão mensurada entre elas. A média da carga repulsão apresentada foi 7,23 mV em pH 5.5.

O movimento browniano das NpCHOs em suspensão fez com que a luz laser fosse espalhada com intensidades diferentes. Assim a medição mostrou que a suspensão de NpCHOs é polidispersa apresentando Pdl 0,633, uma vez que Pdl abaixo de 0,5 se caracterizam como sistemas mais monodispersos. As NpCHOs apresentaram diâmetros menores que 1000 nm, sendo que a média de diâmetro encontrada nas partículas foi de 854,8 nm (Figura 9).

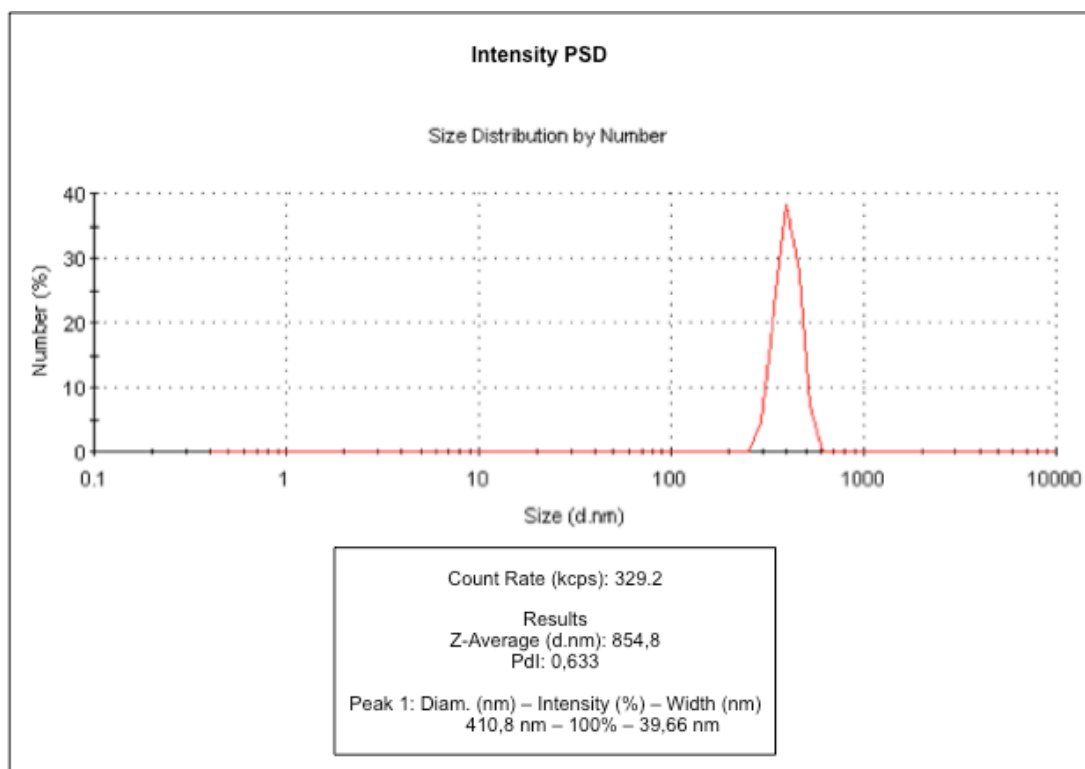


Figura 9: Medição do tamanho em diâmetro das NpCHOs por meio do DLS.

5.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Na imagem obtida por MET (Figura 10) foi observado o tamanho de 200 nm e formato circular irregular da NpCHO.

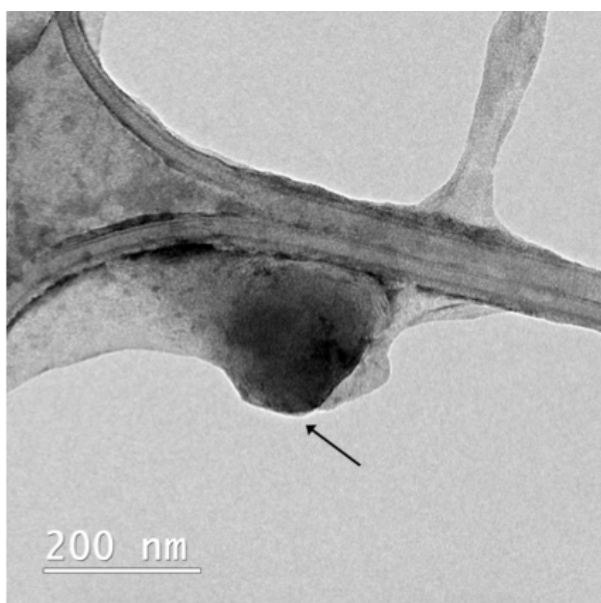


Figura 10: Imagem de MET da NpCHO com barra de escala de 200 nm.

5.5 Ensaio de proteção

Ao final do ponto de eutanásia realizado na infecção experimental (Figura 11), os ensaios de proteção de grupos BALB/c utilizando vacina terapêutica de adjuvante nanopartículas de quitosana (NpCHO), peptídeos ligados (PEP LIG), peptídeos soltos (PEP SOL), nanopartículas de quitosana e peptídeos ligados (NpCHO PEP LIG), nanopartículas de quitosana e peptídeos soltos (NpCHO PEP SOL), Nanopartículas de quitosana e Pb27r ligado (NpCHO Pb27r LIG), nanopartículas de quitosana e Pb27r solto (NpCHO Pb27r SOL) foram avaliados nos pontos de eutanásia de 49 e 56 dias após infecção.

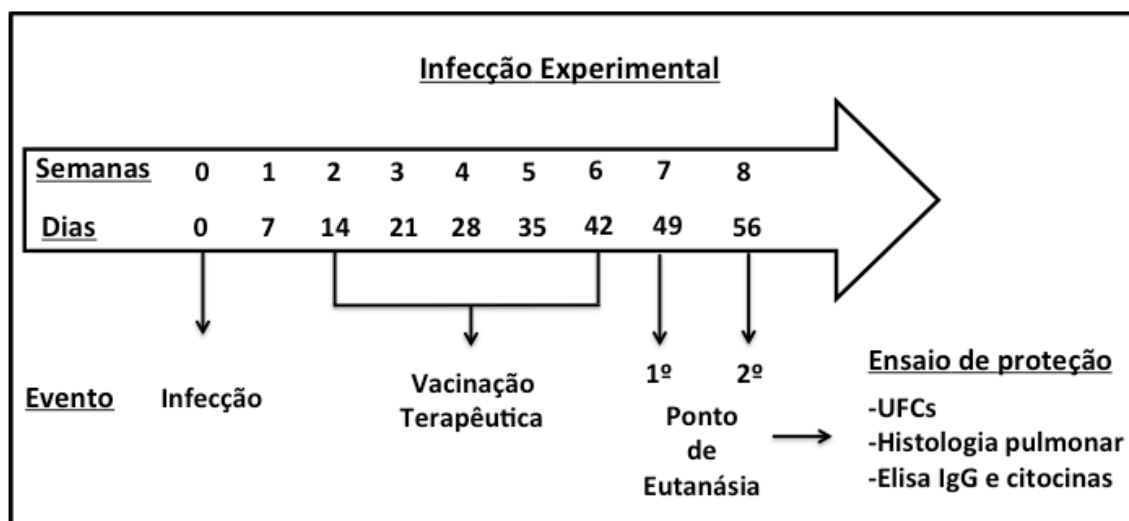


Figura 11: Desenho da linha do tempo experimental.

5.5.1 Sobrevivência após a infecção

A sobrevivência durante a fase experimental, ao longo dos 56 dias após a infecção, foi analisada e os camundongos do grupo CP tiveram menor sobrevivência que os demais grupos deste trabalho. Os grupos que receberam as vacinas terapêuticas NpCHO PEP SOL, NpCHO PEP LIG e NpCHO Pb27r SOL tiveram maior sobrevivência em relação aos outros grupos de vacinação terapêutica que, por sua vez, também tiveram maior porcentagem de sobrevivência em relação ao CP (Figura 12).

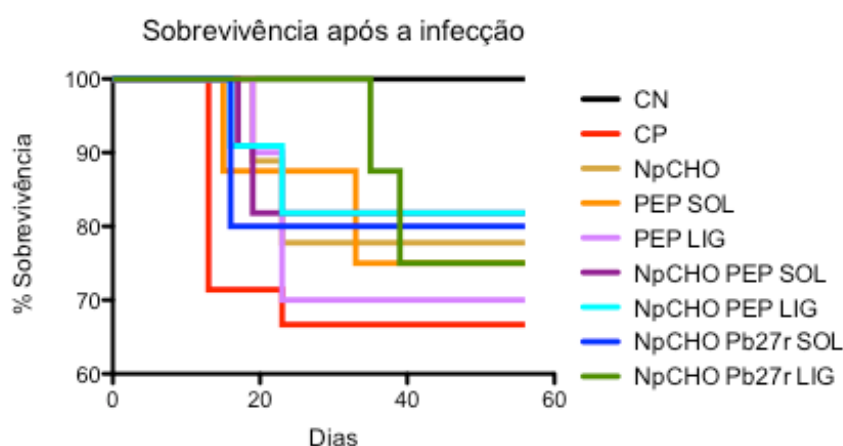


Figura 12: Porcentagem dos grupos de camundongos que sobreviveram durante os 56 dias após a infecção.

5.5.2 Determinação da atividade protetora da formulação vacinal pela avaliação das UFCs

Na análise de UFCs (Figura 13) foi possível observar que no 1º ponto de eutanásia de 49 dias após a infecção, as vacinações terapêuticas com NpCHO PEP SOL e NpCHO Pb27r SOL foram capazes de reduzir a carga fúngica a níveis indetectáveis e a vacina terapêutica NpCHO PEP LIG também reduziu a carga fúngica significativamente (Figura 13a). No 2º ponto de eutanásia de 56 dias após a infecção, a carga fúngica se manteve indetectável nos grupos de vacinação terapêutica NpCHO PEP SOL e NpCHO Pb27r SOL comparada ao CP (Figura 13b).

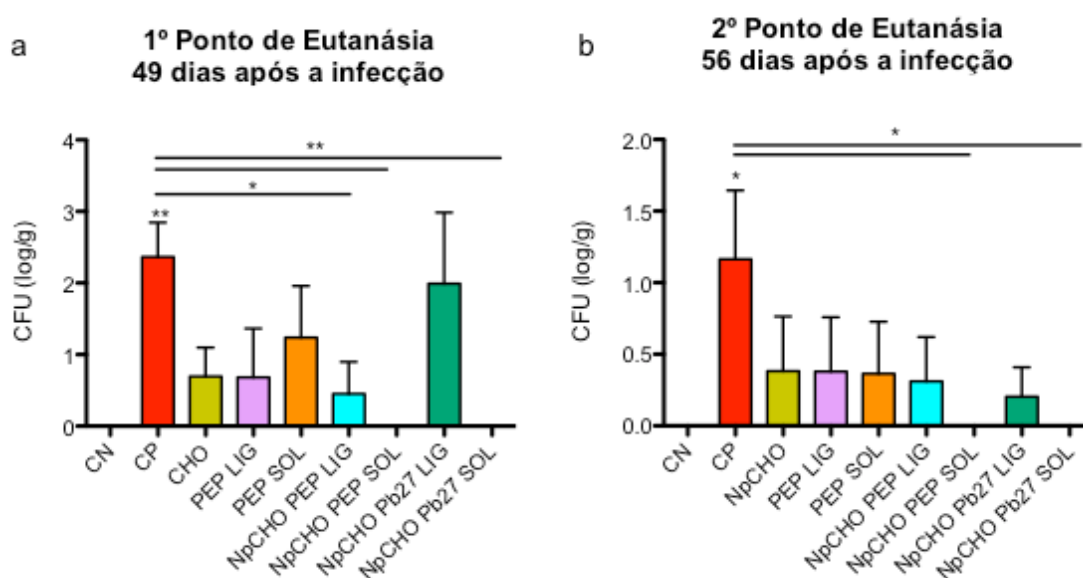


Figura 13: Detecção de UFCs em pulmões de camundongos infectados com 3×10^5 células leveduriformes de *P. brasiliensis* e analisados nos pontos de eutanásia de 49 e 56 dias após a infecção. Cada barra representa a média e o desvio padrão de pulmões por grupo experimental. *diferença significativa $p < 0.05$, ** diferença significativa $p < 0.002$ realizada com *One-Way ANOVA* e pós teste Dunnett. (a) carga fúngica reduzida nos grupos NpCHO PEP SOL, NpCHO PEP LIG e NpCHO Pb27r SOL comparada ao CP com maior número de UFCs recuperadas em BHI. (b) carga fúngica não detectada nos grupos NpCHO PEP SOL e NpCHO Pb27r SOL comparada ao CP com menor número de UFCs recuperadas em BHI.

5.5.3 Avaliação da produção de Imunoglobulinas por ELISA utilizando peptídeos selecionados da Pb27

Os 1º e 2º Pontos de Eutanásia avaliados no ensaio de ELISA, utilizando os 6 peptídeos juntos (*pool*), mostraram que os grupos de camundongos com vacinação terapêutica de PEP LIG, NpCHO PEP SOL e NpCHO PEP LIG apresentaram o mesmo perfil sorológico de IgG anti-peptídeos da Pb27r em relação ao CP e ao CN (Figura 14). Os grupos NpCHO e PEP SOL apresentaram diferença significativa em relação ao CP somente no 1º ponto de eutanásia (Figura 14a).

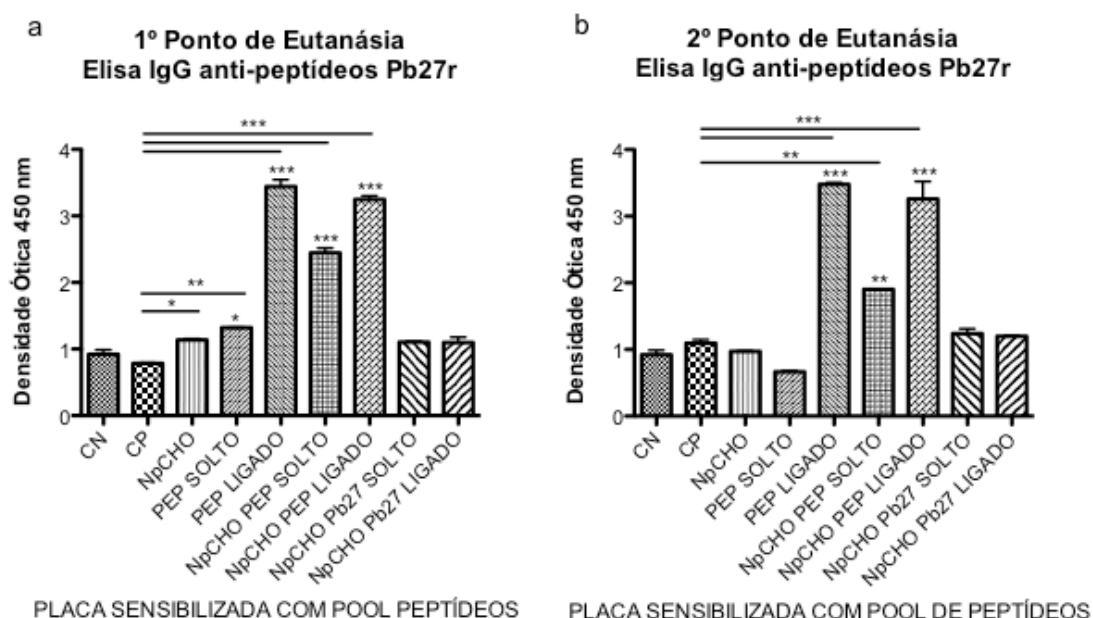


Figura 14: Detecção de níveis de IgG anti-peptídeos da Pb27r em placa sensibilizada com *pool* de peptídeos. (a) Análise da produção de anticorpos utilizando a técnica de ELISA realizada com soros do 1º Ponto de Eutanásia, ou seja, 49 dias após a infecção. (b) Análise de anticorpos utilizando a técnica de ELISA realizada com soros do 2º Ponto de Eutanásia,

ou seja, 56 dias após a infecção. *diferença significativa $p < 0.05$, ***diferença significativa $p < 0.001$.

Ao avaliar os subtipos de IgG (Figura 15), foi possível detectar diferença significativa na produção de IgG 1 e IgG 2b anti-peptídeos da Pb27r em grupos com vacinação terapêutica NpCHO PEP LIG e PEP LIG em relação ao CN e ao CP, sendo que IgG 1 foi o subtipo mais produzido (Figura 15a, 15b e 15e). Foi possível detectar diferença significativa na produção de IgG 2a e IgG 2b anti-peptídeos da Pb27r em grupos com vacinação terapêutica NpCHO PEP LIG em relação ao CN e ao CP (Figura 15c, 15d e 15f). CP e CN não apresentaram diferença significativa na produção dos subtipos de IgG.

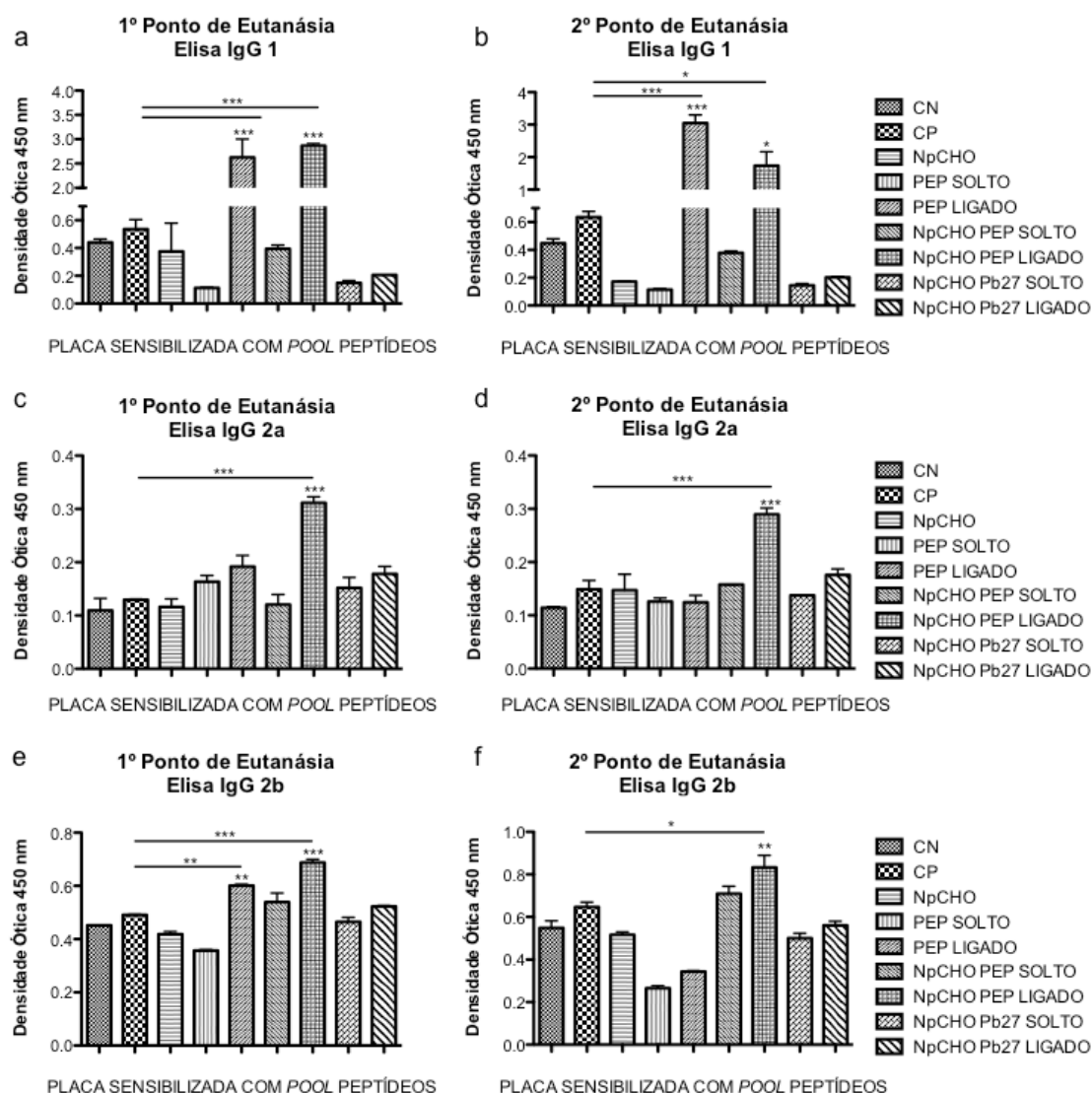


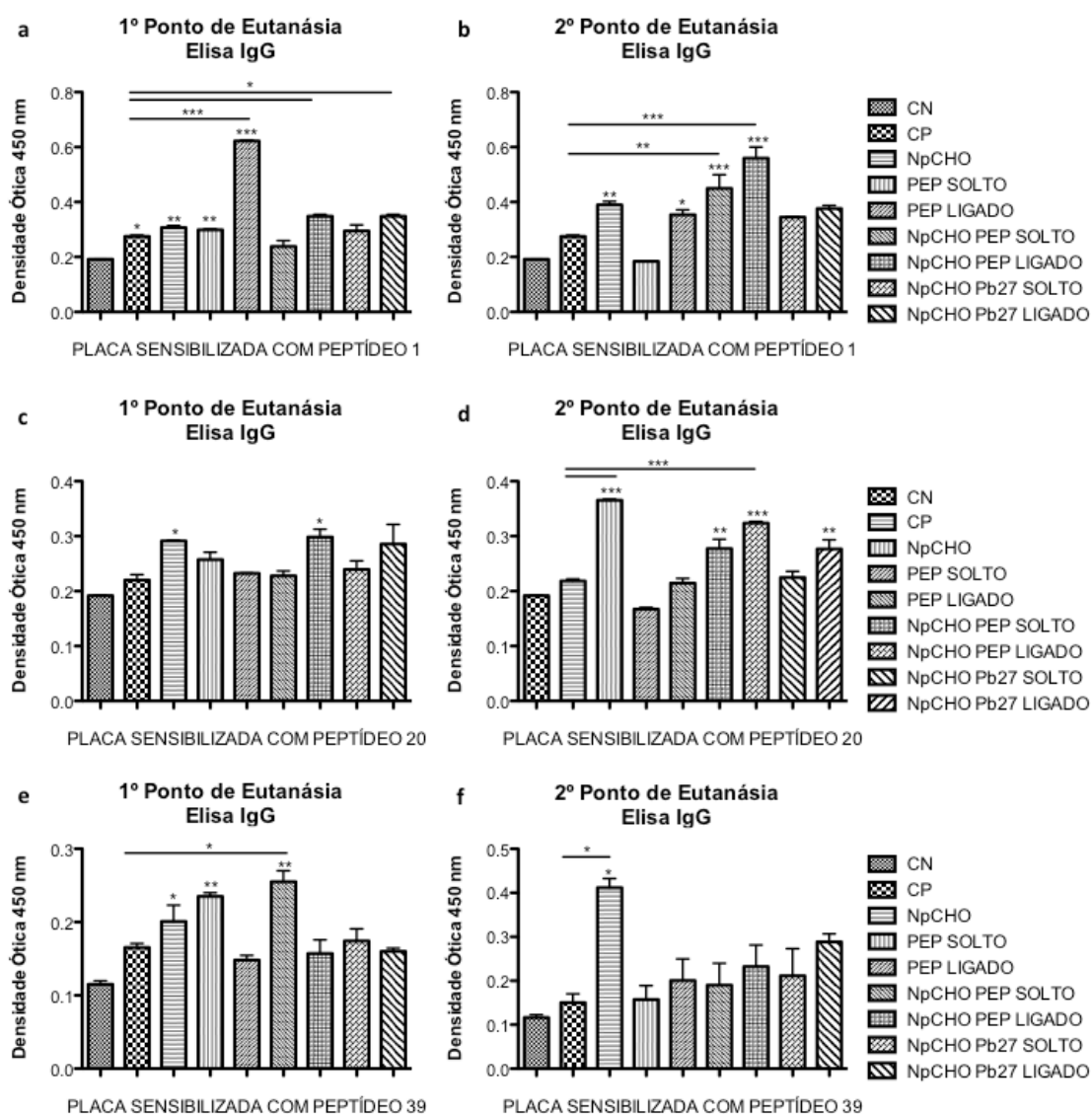
Figura 15: Detecção de níveis de subtipos de IgG anti-peptídeos da Pb27r em placa sensibilizada com *pool* de peptídeos. (a, b) Análise da produção IgG 1 utilizando a técnica de

ELISA realizada com soros do 1º e 2º Ponto de Eutanásia, ou seja, 49 e 56 dias após a infecção respectivamente. (c, d) Análise de IgG 2a utilizando a técnica de ELISA realizada com soros do 1º e 2º Ponto de Eutanásia, ou seja, 49 e 56 dias após a infecção respectivamente. (e, f) Análise de IgG 2b utilizando a técnica de ELISA realizada com soros do 1º e 2º Ponto de Eutanásia, ou seja, 49 e 56 dias após a infecção respectivamente. *diferença significativa $p < 0.05$, ***diferença significativa $p < 0.001$.

Ao avaliar o peptídeo mais reativo entre os 6 peptídeos utilizados na formulação vacinal (Figura 16), foi possível observar o reconhecimento significativo, nas vacinas terapêuticas NpCHO PEP LIG e NpCHO PEP SOL. Estas vacinas estimularam alta produção de IgGs que reconheceram e se ligaram ao peptídeo 60. Foi possível observar diferença significativa desses grupos em relação ao CP e ao CN (Figura 16g, 16h).

Além do peptídeo 60, o peptídeo 1 foi reconhecido por IgGs presentes nos soros dos grupos NpCHO Pb27r LIG, NpCHO PEP LIG, PEP LIG comparados ao grupo CP e, também, IgGs presentes nos soros dos grupos PEP LIG, PEP SOL, NpCHO comparados ao grupo CN. Somente nesta análise foi observada diferença significativa entre grupo CP e CN (Figura 16a). Já no 2º Ponto de Eutanásia, o grupo NpCHO PEP SOL e NpCHO PEP LIG apresentaram diferença significativa em relação ao grupo CP e CN (Figura 16b).

O peptídeo 20 no 1º Ponto de Eutanásia (Figura 16c), o peptídeo 86 no 1º e 2º Ponto de Eutanásia (Figura 16k, 16l) e o peptídeo 39 no 2º Ponto de Eutanásia (Figura 16f), foram os peptídeos menos reconhecidos frente aos IgGs anti-peptídeos da Pb27r presentes nos soros dos grupos de vacina terapêutica analisados. Já o peptídeo 39 (Figura 16e) foi detectado significativamente ao grupo de vacina terapêutica NpCHO PEP SOL em relação ao grupo CN e CP.



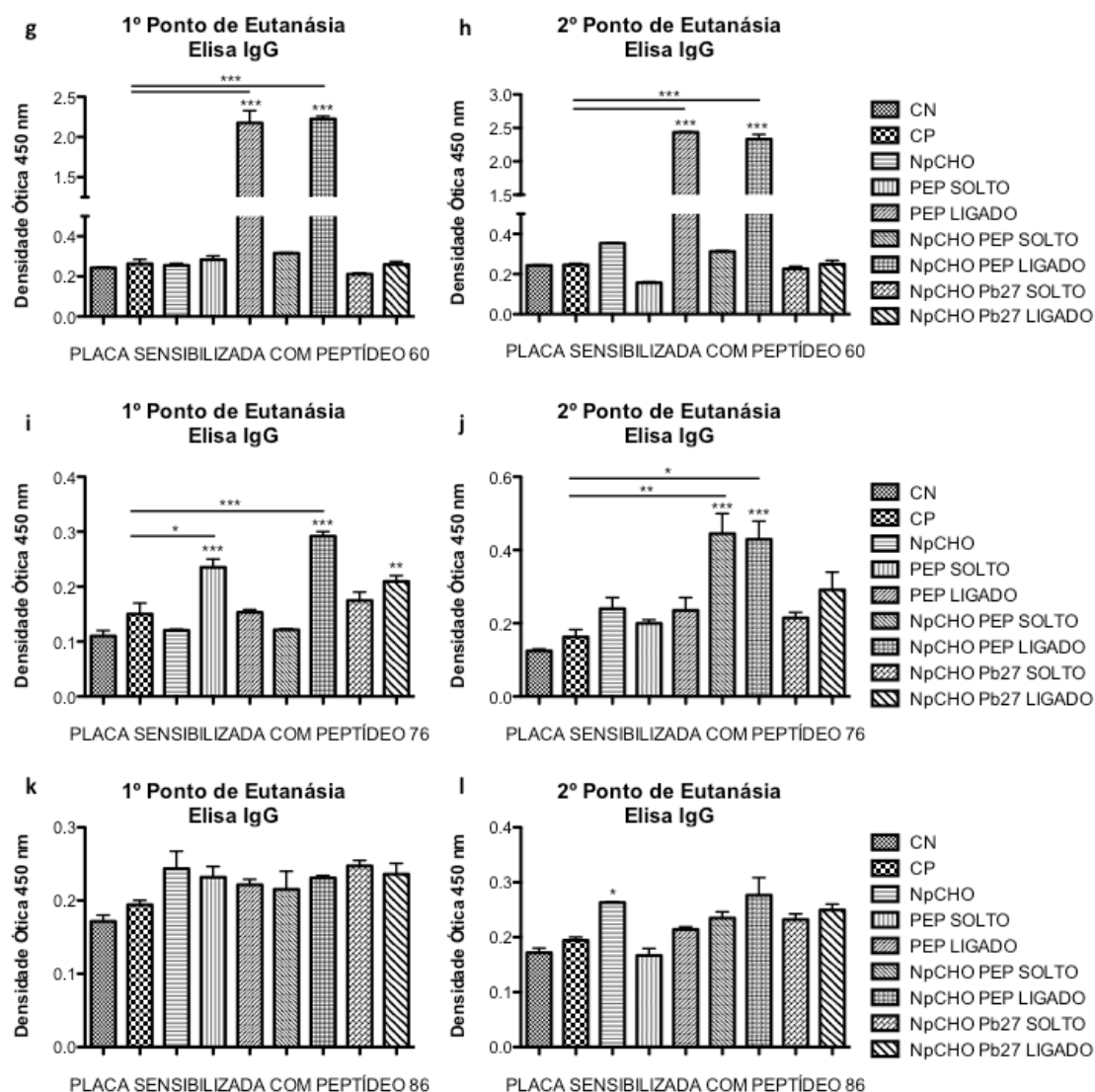


Figura 16: Avaliação da reatividade entre os soros de grupos com vacinação terapêutica e os 6 peptídeos testados isoladamente. (a, b) Análise da reatividade entre peptídeo 1 e soros dos diferentes grupos de vacina terapêutica no 1º e 2º Ponto de Eutanásia. (c, d) Análise da reatividade entre peptídeo 20 e soros dos diferentes grupos de vacina terapêutica no 1º e 2º Ponto de Eutanásia. (e, f) Análise da reatividade entre peptídeo 39 e soros dos diferentes grupos de vacina terapêutica no 1º e 2º Ponto de Eutanásia. (g, h) Análise da reatividade entre peptídeo 60 e soros dos diferentes grupos de vacina terapêutica no 1º e 2º Ponto de Eutanásia. (i, j) Análise da reatividade entre peptídeo 76 e soros dos diferentes grupos de vacina terapêutica no 1º e 2º Ponto de Eutanásia. (k, l) Análise da reatividade entre peptídeo 86 e soros dos diferentes grupos de vacina terapêutica no 1º e 2º Ponto de Eutanásia. *diferença significativa $p < 0.05$, ***diferença significativa $p < 0.001$.

5.5.4 Avaliação histológica dos pulmões dos camundongos infectados e ou vacinados após 1º e 2º Ponto de Eutanásia

As avaliações histológicas dos tecidos corados por HE (Figura 17 e 18) e Gomori (Figura 19), foram realizadas 49 e 56 dias após a infecção pelo *P. brasiliensis*.

Na análise de 49 dias após a infecção (1º Ponto de Eutanásia), no grupo CN não houve presença de infiltrado inflamatório, a região do parênquima foi preservada (CN 200 µm e 100 µm). Em maior aumento (20 µm) foi possível visualizar as paredes dos alvéolos formados por camada única de células epiteliais e sem agregação de células nos sacos alveolares (Figura 17.1 – CN).

No grupo CP foi possível observar formação granulomatosa (círculos – CP 200 µm) e um grande infiltrado inflamatório localizado no interstício pulmonar que comprime o saco alveolar, bronquíolos e brônquios (CP 200 e 100 µm). Os alvéolos apresentam engrossamento da camada de células epiteliais e o infiltrado inflamatório é caracterizado pela presença de células mononucleadas agregadas formando células gigantes (CP 20 µm). No interior e ao redor das células gigantes é possível visualizar vários núcleos e células birrefringentes que não são coradas por HE. Estas células são as leveduras de *P. brasiliensis* (Figura 17.1 – CP).

Os grupos experimentais (Figura 17.2) não apresentaram granulomas, porém houve presença de infiltrado inflamatório em menor quantidade no grupo NpCHO PEP SOL aumentando, respectivamente, nos grupos NpCHO PEP LIG, NpCHO Pb27r SOL e NpCHO Pb27r LIG. A quantidade de células leveduriformes encontradas aumentou sequencialmente nos grupos NpCHO PEP SOL, NpCHO PEP LIG, NpCHO Pb27r SOL e NpCHO Pb27r LIG. Foi possível observar melhora na parede dos alvéolos e melhora na reestruturação do parênquima.

Nos grupos experimentais de componentes isolados da vacina terapêutica, PEP SOL, PEP LIG e NpCHO (adjuvante e antígenos) foi possível observar desorganização tecidual em relação ao CN com presença de infiltrado inflamatório, células gigantes com fungo em seu interior e formação de granuloma. No grupo NpCHO foi possível observar diminuição de infiltrado inflamatório e células fúngicas (Figura 17.3).

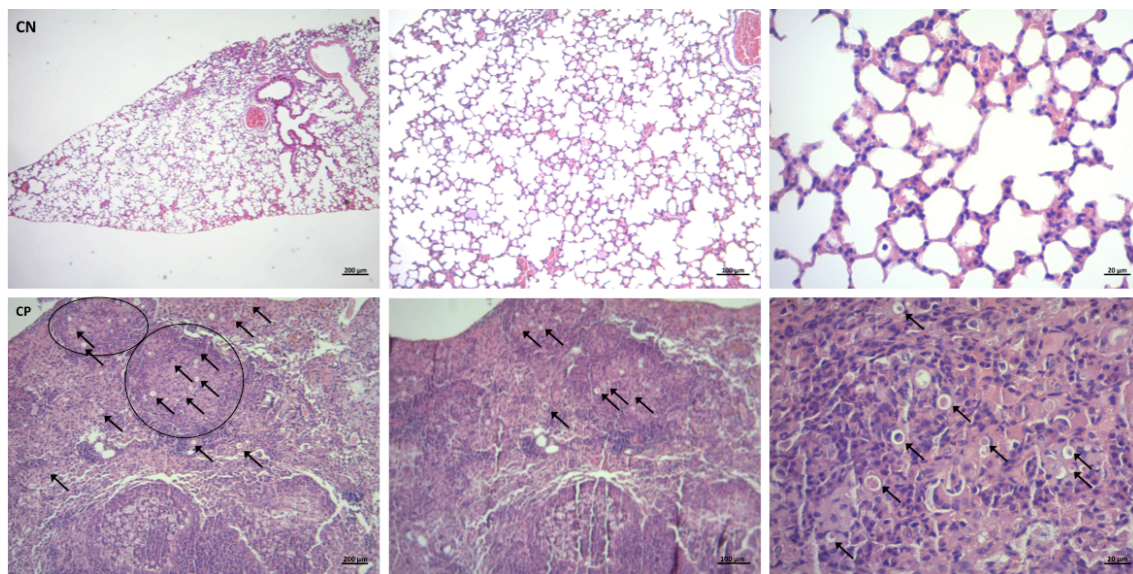


Figura 17.1: Avaliação histológica do pulmão com 49 dias após a infecção dos grupos CN e CP respectivamente. As fotos em menor aumento para maior aumento são 200 μm , 100 μm e 20 μm respectivamente. As setas apontam células leveduriformes de *P. brasiliensis* no aumento de 200, 100 e 20 μm . As regiões de coloração mais clara são células gigantes com vários núcleos e sem o contorno celular.

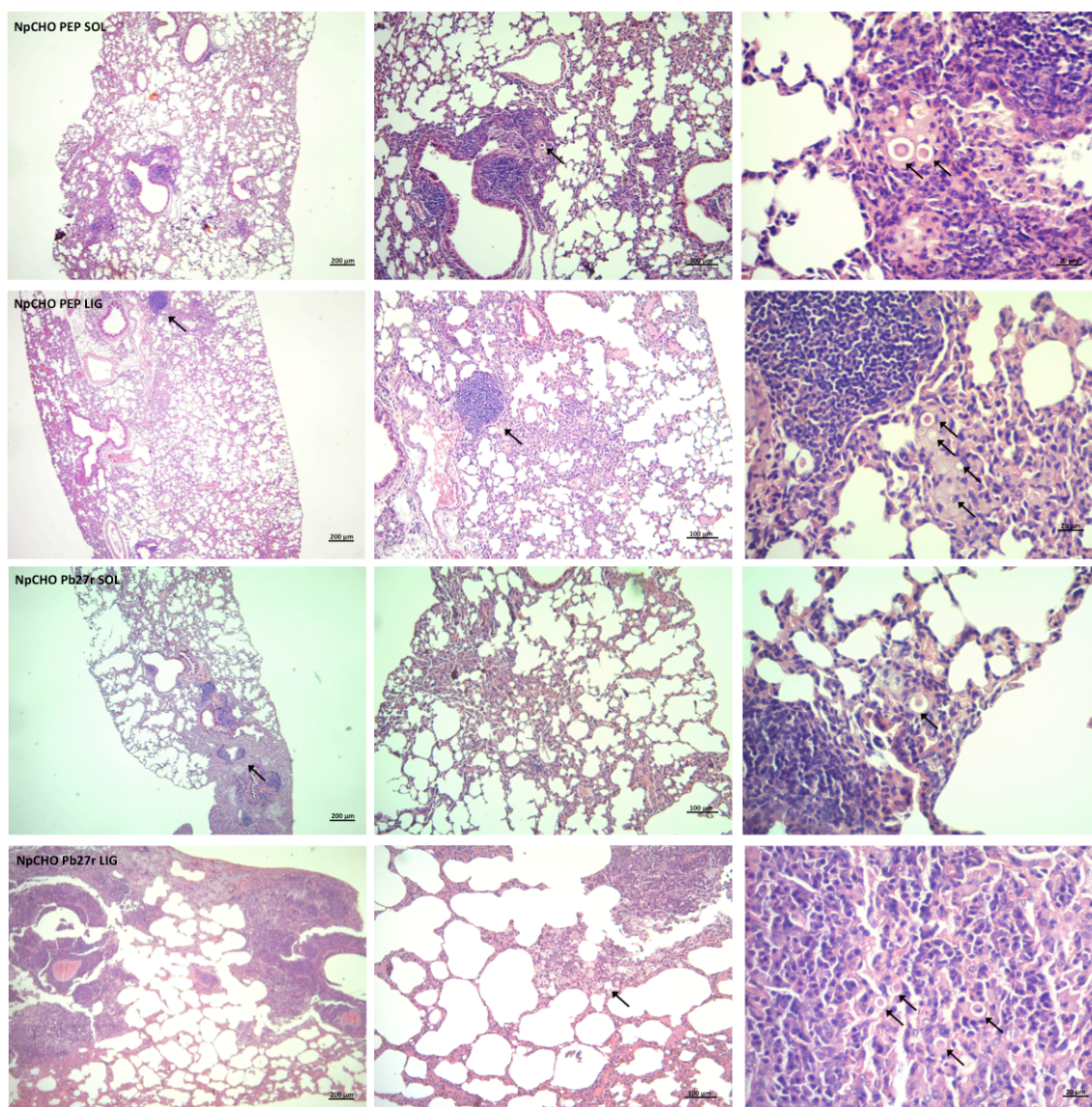


Figura 17.2: Avaliação histológica do pulmão com 49 dias após a infecção dos grupos NpCHO PEP SOL, NpCHO PEP LIG, NpCHO Pb27r SOL e NpCHO Pb27r LIG respectivamente. As fotos em menor aumento para maior aumento são 200 μm (4X), 100 μm (10X) e 20 μm (40X) respectivamente. As setas apontam células leveduriformes de *P. brasiliensis* na escala de 200, 100 e 20 μm . As regiões de coloração mais clara são células gigantes com vários núcleos e sem o contorno celular.

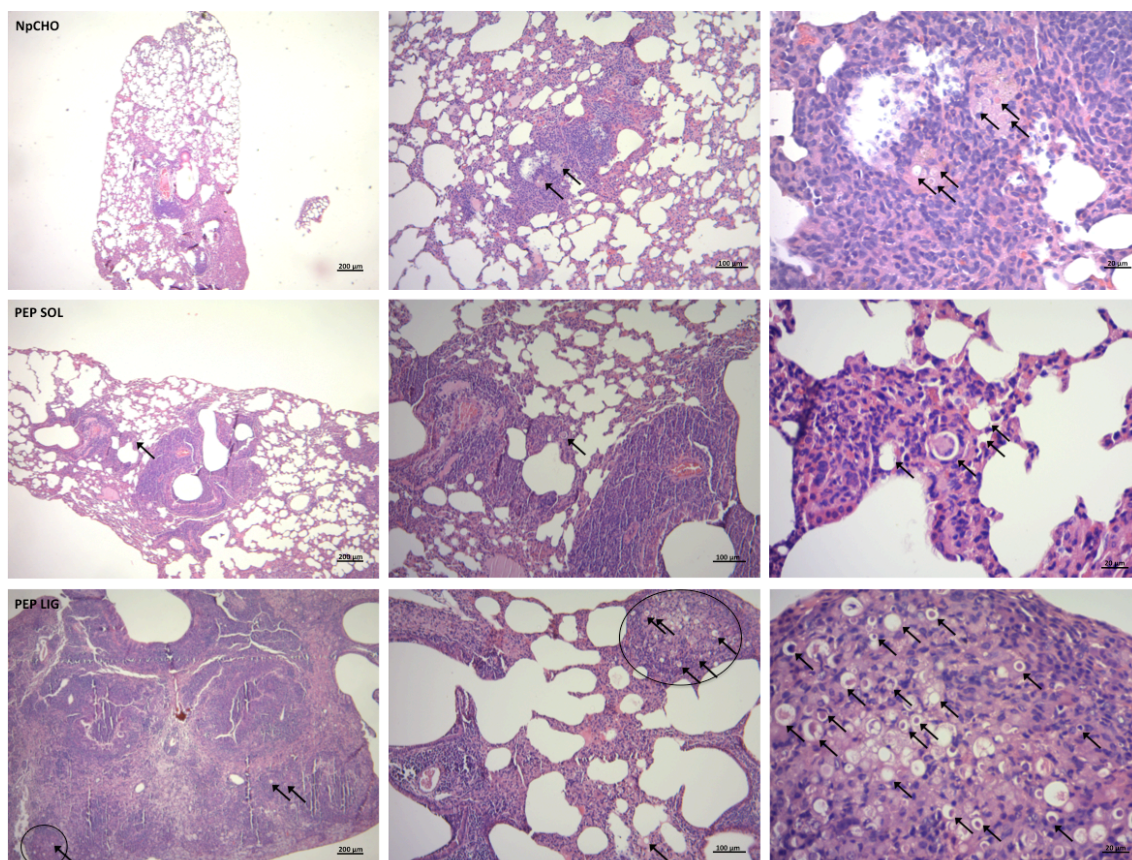


Figura 17.3: Avaliação histológica do pulmão com 49 dias após a infecção dos grupos NpCHO, PEP SOL e PEP LIG respectivamente. As fotos em menor aumento para maior aumento são 200 µm (4X), 100 µm (10X) e 20 µm (40X) respectivamente. As setas apontam células leveduriformes de *P. brasiliensis* na escala de 200, 100 e 20 µm. Círculo representa área com formação de granuloma.

Na análise de 56 dias após a infecção (2º Ponto de Eutanásia), o grupo CN e CP apresentaram as mesmas características que a análise de 49 dias após a infecção (Figura 18.1 – CN), assim como os demais grupos experimentais da figura 18.2 e 18.3. Foi possível observar um aumento de células fagocíticas com leveduras de *P. brasiliensis* em seu interior NpCHO PEP SOL e NpCHO PEP LIG (Figura 18.2).

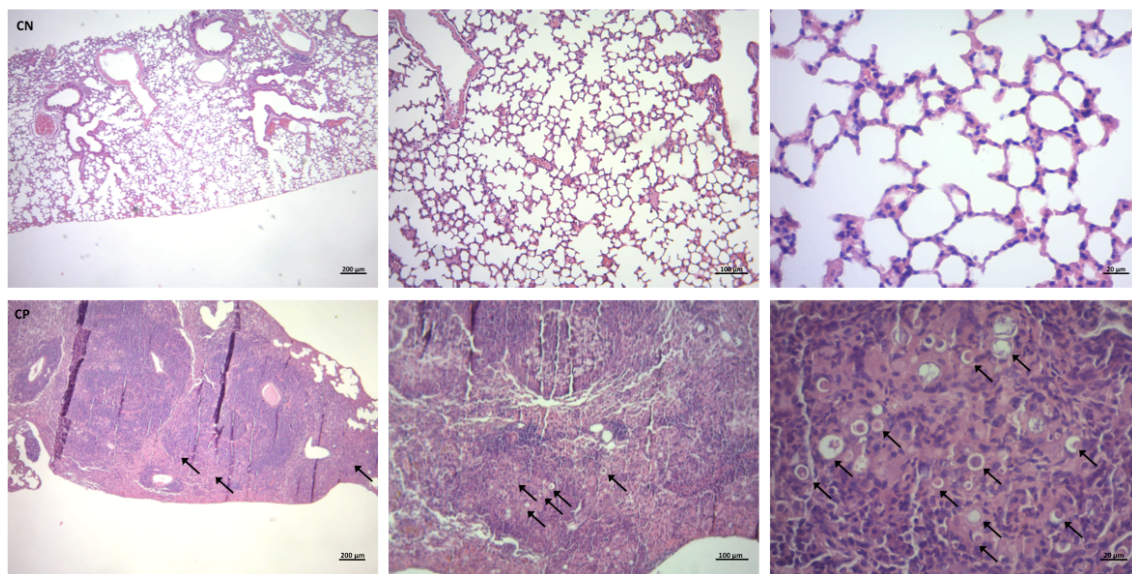


Figura 18.1: Avaliação histológica do pulmão com 56 dias após a infecção dos grupos CN e CP respectivamente. As fotos em menor aumento para maior aumento são 200 μm (4x), 100 μm (10x) e 20 μm (40x) respectivamente. As setas apontam células leveduriformes de *P. brasiliensis* no aumento de 200, 100 e 20 μm .

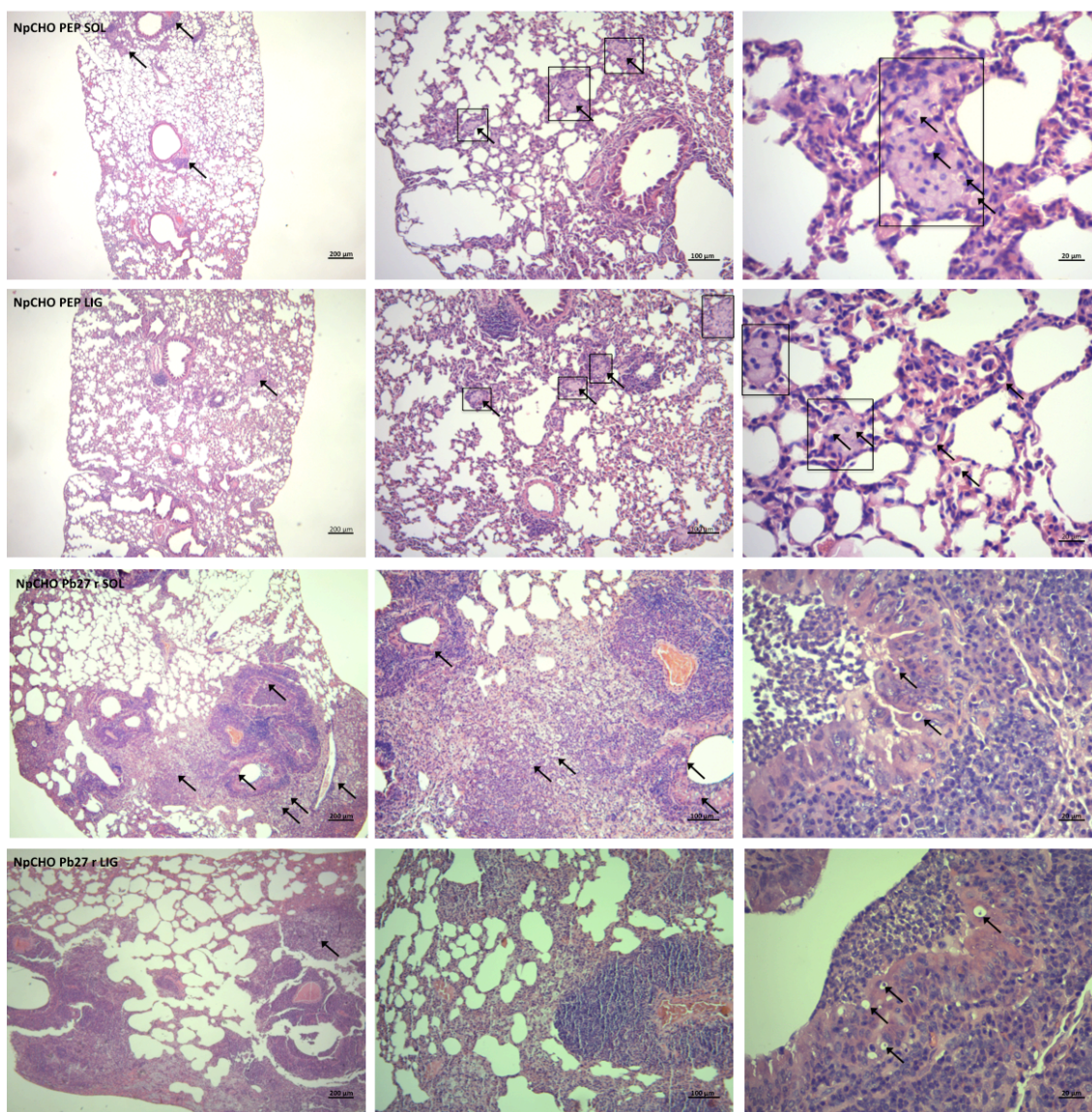


Figura 18.2: Avaliação histológica, por coloração de HE, do pulmão com 56 dias após a infecção dos grupos NpCHO PEP SOL, NpCHO PEP LIG, NpCHO Pb27r SOL, NpCHO Pb27r SOL respectivamente. As fotos em menor aumento para maior aumento são 200 µm (4x), 100 µm (10x) e 20 µm (40x) respectivamente. As setas apontam células leveduriformes de *P. brasiliensis* e os quadros representam células fagocitárias com células leveduriformes de *P. brasiliensis* no aumento de 200, 100 e 20 µm.

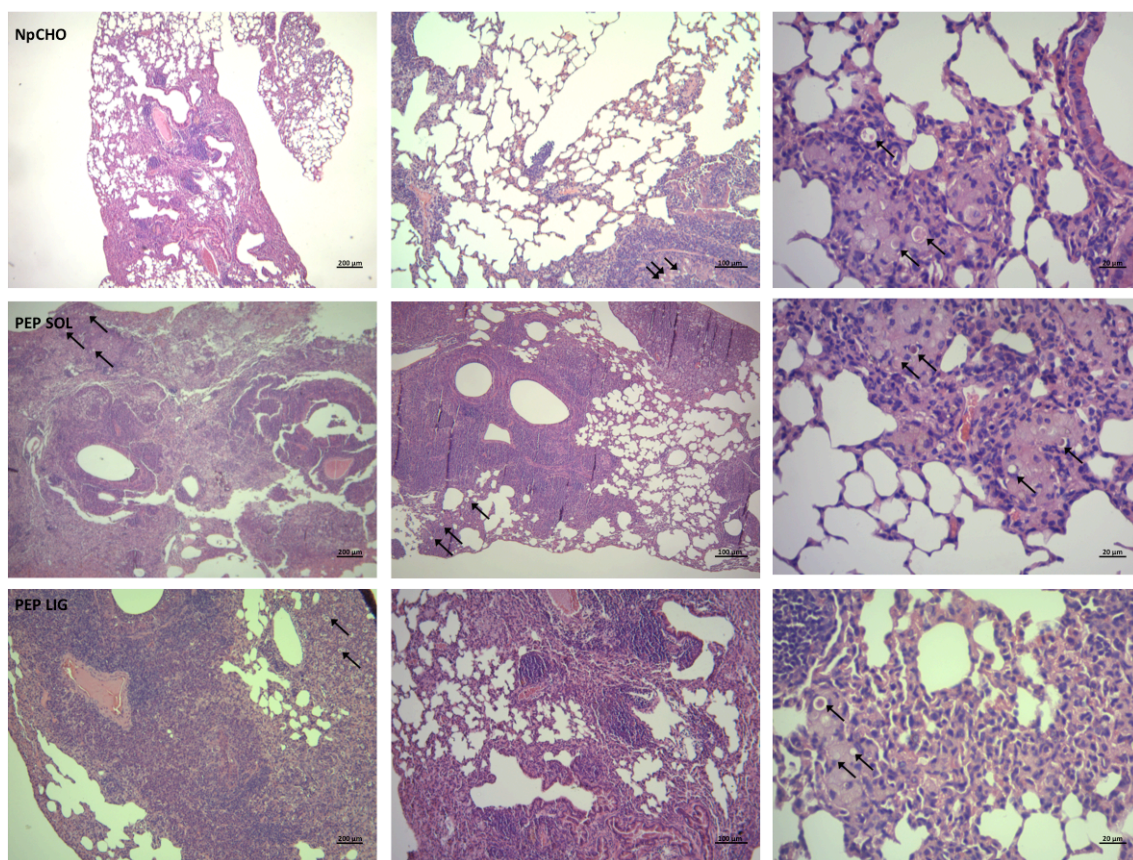


Figura 18.3: Avaliação histológica, por coloração de HE, do pulmão com 56 dias após a infecção dos grupos NpCHO, PEP SOL e PEP LIG respectivamente. As fotos em menor aumento para maior aumento são 200 μm (4x), 100 μm (10x) e 20 μm (40x) respectivamente. As setas apontam células leveduriformes de *P. brasiliensis* no aumento de 200, 100 e 20 μm .

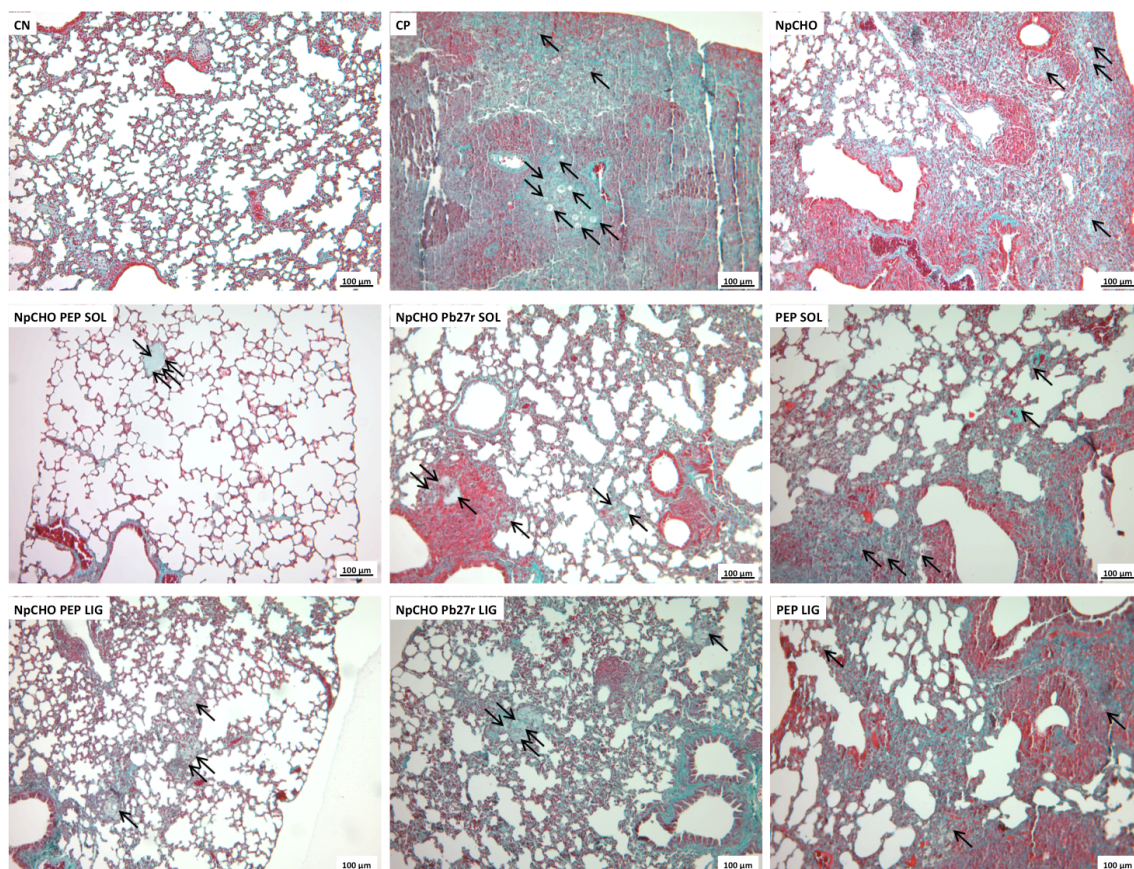


Figura 19.1: Avaliação histológica, por coloração de tricômio de gomori, do pulmão com 49 dias após a infecção dos grupos CN, CP, NpCHO, NpCHO PEP SOL, NpCHO Pb27r SOL, PEP SOL, NpCHO PEP LIG, NpCHO Pb27r LIG e PEP LIG respectivamente. As fotos estão com escala de 100 µm. As setas apontam células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

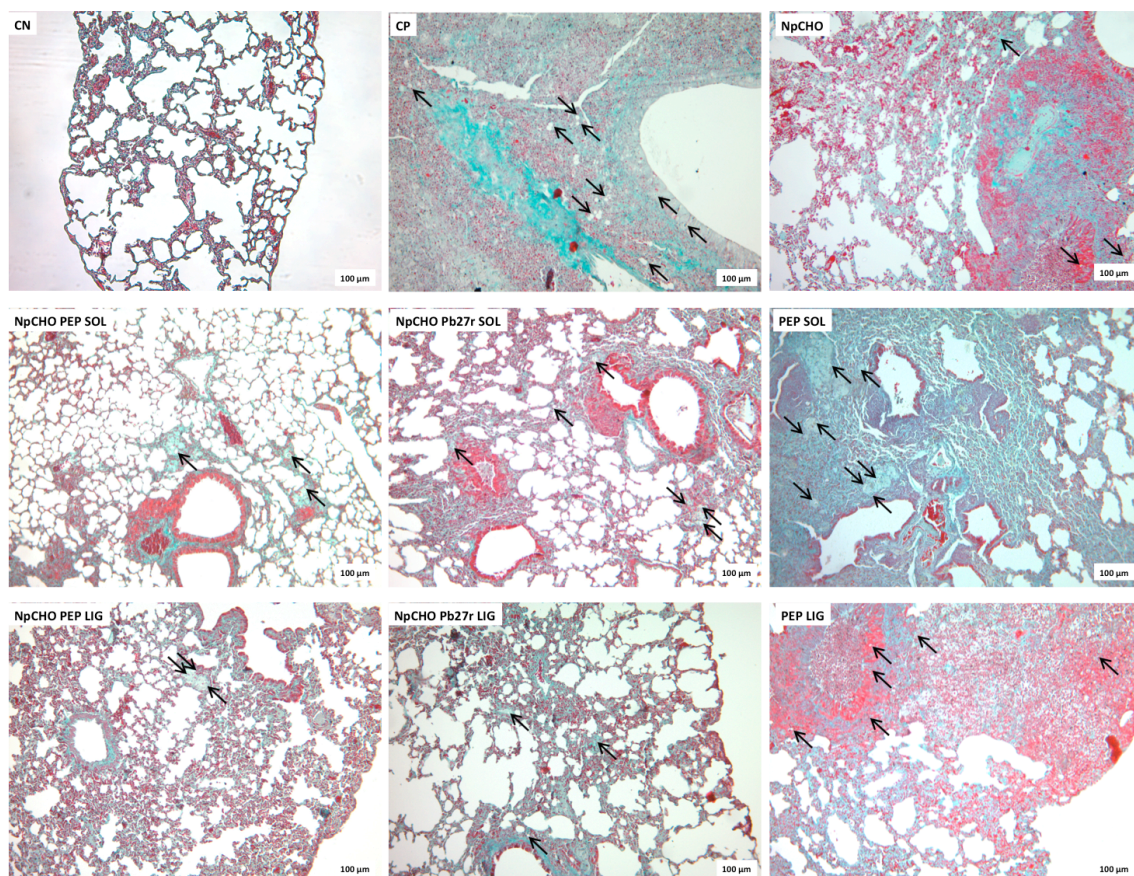


Figura 19.2: Avaliação histológica, por coloração de tricômio de gomori, do pulmão com 56 dias após a infecção dos grupos CN, CP, NpCHO, NpCHO PEP SOL, NpCHO Pb27r SOL, PEP SOL, NpCHO PEP LIG, NpCHO Pb27r LIG e PEP LIG respectivamente. As fotos estão com escala de 100 µm. As setas apontam células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

6 DISCUSSÃO

A PCM é a maior causa de morte entre as micoses sistêmicas no Brasil e a oitava causa de morte por doenças infecciosas crônicas causando 1.65 mortes por 10⁶ de habitantes (Bocca *et al.*, 2013). Atinge principalmente população com baixo recurso sócio-econômico oriundos de áreas rurais, provocando uma disfunção tecidual prolongada nos anos mais produtivos da vida. Com o fato da PCM não ser doença de notificação compulsória, os índices reportados são subestimados e de baixa visibilidade, dificultando o diagnóstico e tratamento (Coutinho *et al.*, 2002).

Na maioria dos casos a doença progride de forma assintomática e quando o diagnóstico é determinado, já existem sequelas estabelecidas. Mesmo sendo possível alcançar a cura clínica, o tratamento não é eficaz para impedir as sequelas e os casos de recidiva (Bocca *et al.* 2013). Por isso são necessárias outras alternativas de tratamento.

Para prevenir e tratar contra PCM, descrita por se manifestar principalmente em indivíduos imunodeficientes, são utilizadas estratégias imunomodulatórias para obter resposta protetora (Travassos & Taborda, 2012). Sendo assim, a identificação de antígenos é importante para a produção de vacinas profiláticas ou terapêuticas que possam ser utilizadas, por um período mais curto, contra a PCM.

Uma alternativa promissora é a terapia utilizando vacina com antígenos fúngicos, estudada no meio científico, que pode levar a uma resposta imune eficiente impedindo uma possível recidiva da PCM (Travassos *et al.*, 2015).

No contexto de antígenos fúngicos, a glicoproteína gp43 de *P. brasiliensis* tem sido amplamente estudada. Os peptídeos derivados da gp43 foram estudados como vacina terapêutica e esta mostrou pouca eficiência na redução da carga fúngica após a infecção (Taborda *et al.*, 2015; Cisalpino *et al.*, 1996). Células leveduriformes de *P. brasiliensis* radio atenuadas também foram utilizadas como vacina terapêutica contra PCM e esta promoveu a redução de carga fúngica nos animais imunizados (Martins *et al.*, 2009).

Em nosso laboratório, o antígeno de 27 kDa de *P. brasiliensis* (Pb27r) foi estudado em protocolo terapêutico associado a adjuvante e mostrou redução de granulomas, redução de UFCs, aumento de IgG 1 e IgG 2b (Reis *et al.*, 2008). No protocolo terapêutico com Pb27r associado a adjuvante e fluconazol (Fernandes *et al.*, 2011b) e no protocolo terapêutico com Pb27r associada a outro antígeno de 40 kDa (Pb40r) de *P. brasiliensis* e adjuvante também mostraram redução de UFCs e

granulomas (Fernandes *et al.*, 2011a). O adjuvante utilizado nestes trabalhos terapêuticos com Pb27r (antígeno fúngico) foi *C. parvum* e hidróxido de alumínio.

Sendo assim, a Pb27r é uma proteína antigênica de *P. brasiliensis* que mostrou uma atividade protetora significativa como vacina terapêutica contra PCM em modelos experimentais. Com o intuito de aprofundar nos estudos sobre as propriedades imunogênicas da Pb27r contra PCM, epítomos lineares desta proteína foram preditos epítomos utilizando métodos específicos para linfócito B e T (Singh & Raghava, 2001; Saha & Raghava, 2006) e, posteriormente, foram selecionados utilizando soros de pacientes com PCM.

Através do método de imunoensaio de peptídeo em spot, foram selecionados 1 epítomo específico de LB, 3 epítomos específicos de LT e 2 epítomos preditos, em comum, de linfócitos B e T. Embora a seleção tenha sido realizada por meio do reconhecimento de anticorpos, estudos indicam que epítomos imunodominantes de linfócitos B e T podem se sobrepor na sequência antigênica (Wucherpfennig *et al.*, 1997; Bateman *et al.*, 2004) e a sobreposição pode ser favorável na modulação da resposta imunológica, uma vez que os linfócitos B são capazes de apresentar antígenos e assim podendo aumentar a exposição do determinante antigênico para linfócitos T (Simitsek *et al.*, 1995).

Posteriormente, para avaliação do efeito dos 6 epítomos na PCM experimental, foi necessário superar as limitações intrínsecas ao uso de peptídeos sintéticos. Limitações como a fácil degradação dos peptídeos no hospedeiro e a baixa imunogenicidade dos peptídeos, uma vez que não há material infeccioso (Celis, 2002).

Na formulação de vacina composta de peptídeos sintéticos, os adjuvantes são fundamentais para atrair os componentes do sistema imunológico (Irvine *et al.*, 2013). Porém, o hidróxido de alumínio amplamente utilizado em experimentos científicos, como em nosso laboratório por exemplo, induziu resposta inflamatória exacerbada nos animais controle (Reis *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2011b)

Os sais de alumínio são moduladores de perfil imunológico TH2 e não é adequado contra infecções causadas por microrganismos intracelulares (Lindblad, 2004), sendo assim, o uso de adjuvantes adequados na PCM é importante para modulação de perfil imunológico protetor, uma vez que a resistência ou a susceptibilidade estão associadas a progressão de um perfil TH1 e TH2 respectivamente (Calich *et al.*, 1998).

Na procura de um adjuvante contra a PCM capaz de aumentar a imunogenicidade das vacinas compostas de peptídeos sintéticos, que neste trabalho foram os peptídeos ligados ou soltos, foi escolhida a NpCHO, uma vez que a quitosana já foi descrita por apresentar potencial terapêutico como adjuvante de vacinas contra o câncer aumentando a capacidade imunogênica de antígenos tumorais (Li *et al.*, 2012). Além disso, quitosana é biodegradável, biocompatível, de fácil adesão à mucosa, é boa candidata na administração de drogas por via oral, nasal e ocular, e na terapia antigênica (Garcia Fuentes & Alonso, 2012).

Vários estudos mostram a importância do tamanho das NpCHOs no tipo de resposta imunológica desenvolvida, onde foi observado que a característica polidispersa elevada é um inconveniente da aplicação de NpCHO produzidas por precipitação com sulfato de sódio (Borges *et al.*, 2005), porém é proposto que diâmetros por volta dos 600 nm favorecem o perfil imunológico TH1 (Vibhu Kanchan, 2007). Em nosso trabalho, a NpCHO utilizada apresentou um diâmetro médio de 854,8 nm e podendo ser observada com formato arredondado.

Além disso, a NpCHO utilizada não induziu resposta inflamatória exacerbada e reduziu o infiltrado inflamatório, esses resultados puderam ser observados na histologia do pulmão em relação ao CP e quando a NpCHO foi associada a peptídeos soltos ou Pb27r solta, pode ser observada a redução da carga fúngica a níveis indetectáveis, e quando a NpCHO foi associada a peptídeos ligados também houve redução significativa de UFCs e redução de granulomas em relação ao CP nos dois pontos de eutanásia. As vacinas terapêuticas analisadas também ajudaram na queda da mortalidade dos animais infectados.

Esta característica da NpCHO já foi demonstrada contra outros microrganismos, inclusive fungos (Goy *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2012a). Também já foi descrito que a atividade fungicida da quitosana é atribuída a diferentes propriedades físico-químicas como a presença de cargas positivas que favorecem a interação com a parede celular dos fungos e bactérias promovendo permeabilidade, perda de estabilidade osmótica causando a liberação do material intracelular microbiano que pode amplificar a atração dos componentes do sistema imunológico ao local da infecção (Friedman *et al.*, 2013).

As vacinas terapêuticas NpCHO PEP SOL e NpCHO PEP LIG induziram produção de IgG específicos anti-peptídeos da Pb27r. Ao avaliar qual o peptídeo induziu maior produção de IgG anti-peptídeo da Pb27r, nos dois Pontos de Eutanásia,

foi possível observar valores significativos para o peptídeo 60. As vacinas terapêuticas NpCHO PEP SOL e NpCHO PEP LIG também induziram altos níveis de IgG anti-peptídeo 76 da Pb27r em relação aos controles principalmente no 2º Ponto de Eutanásia. Inclusive o peptídeo 20, que foi pouco reativo frente aos soros de pacientes com PCM, mostrou imunogenicidade ao ser analisado com grupos da vacina terapêutica NpCHO PEP LIG e NpCHO PEP SOL já que foi detectado níveis significativos de IgG anti-peptídeo 20.

Quando os subtipos de IgG foram avaliados na PCM experimental, foi detectada a produção de IgG 1, IgG 2a e IgG 2b induzidas somente pela vacina terapêutica NpCHO PEP LIG. Principalmente IgG 1 apresentou o maior nível significativo em relação ao CN. Este mesmo perfil imunológico já foi descrito em outros trabalhos (Reis *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2011b).

Os resultados deste trabalho demonstram grande potencial no uso combinado de NpCHO e epítomos imunodominantes da Pb27r como vacina terapêutica modulando um perfil imunológico equilibrado capaz de controlar a PCM e preservar o pulmão evitando graves sequelas.

7 CONCLUSÃO

Este estudo permitiu aprofundar sobre os conhecimentos da atividade protetora da Pb27r utilizando seus epítomos na formulação de vacinas terapêuticas. Vacinas estas que foram eficientes induzindo produção de anticorpos, diminuindo a carga fúngica do pulmão, reduzindo infiltrado inflamatório e mortalidade dos animais infectados com *P. brasiliensis*.

Em nosso estudo, foi demonstrada a capacidade microbicida do adjuvante NpCHO sendo melhorada ao associarmos epítomos da Pb27r a ela, promovendo atividade protetora contra PCM experimental.

Foi possível observar um grande potencial na produção de vacina terapêutica baseada em peptídeos sintéticos associados a adjuvante biocompatível.

REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. An. Fac. Med. São Paulo, 1930, v. 5, p. 125-141.
- AMBRÓSIO A. V. A., CAMELO C. C. S., BARBOSA C. V., TOMAZATTI F. G., BRAZÕES F. A. S., VELOSO J. M, RODRIGUES G. V., RODRIGUES L. F., OLIVEIRA P. I. D., AGUIAR R. A., SIQUEIRA V. S., JARDIM V. B., GONTIJO V. A. C., LYON A. C., PAULA I., SANTOS L. S., SULMONETTI N., FREITAS R. M., CRUZ S. G., ARAÚJO S. A., PEDROSO V. S. P, SIQUEIRA W. C., SILVA F. R., CALIGIORNE R. B., GÓES A. M., FERREIRA C. S., PEDROSO E. R. P. Paracoccidioidomicose (doença de Lutz-Splendore-Almeida): propedêutica complementar, diagnóstico diferencial, controle de cura. Rev Med Minas Gerais 2014; 24(1): 81-92
- APOSTÓLICO, J.de S; BOSCARDIN, S.B; YAMAMOTO, M.M; OLIVEIRA-FILHO J.N de; KALIL, J; CUNHA-NETO, E; ROSA, D.S. HIV Envelope Trimer Specific Immune Response Is Influenced by Different Adjuvant Formulations and Heterologous Prime-Boost. Plos One. 2016, 4;11(1):e0145637,.
- ARISTIZABAL, B.; CLEMONS, K.; COCK, A. & QNE DA STEVENS, A. R. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. Med Mycol, 2002, 40(2):169–178.
- AUDIBERT, F. Adjuvants for vaccines, a quest. International Immunopharmacology, 2003, v. 3, p. 1187-1193.
- BANCHEREAU, J. E ROUSSET, F. Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation. Adv Immuno, 1992, 52, 125-262.
- BATEMAN, E. A. L.; FERRY, B. L.; HALL, A.; MISBAH, S. A.; ANDERSON, R. & KELLEHER, P. IgA antibodies of coeliac disease patients recognise a dominant t cell epitope of gliadin. Gut, 2004, 53(9):1274–1278.
- BISCOTTO CR, PEDROSO ERP. ANTIFÚNGICOS. IN: PEDROSO ERP, ROCHA MOC. Antibioticoterapia. Clín Med.2001, 1(4):933-46.
- BLANCO, S.G.; MUÑOZ, J.; TORRES; POSADA, S. D.; GÓMEZ, B.; MCEWEN, J.; RESTREPO & GARCÍA, A. Differential Pb27 expression in the yeast and mycelial forms of the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48:1087–1095.
- BOCCA A. L.; AMARAL A.C.; TEIXEIRA M. M.; SATO P.; SHIKANAI-YASUDA M. A.; FELIPE M. S. S. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. Future Microbiol. 2013, v. 8, p. 1177-1191.
- BONFIM, C.V; MAMONI, R.L; BLOTTA,M.H. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*: Med Mycol, v.47,p. 722- 33,2009.

BOPP C. Algumas considerações sobre a micose de Lutz no Rio Grande do Sul. An Fac Med P Alegre. 1955; 26:97-106.

BORGES, O.; BORCHARD, G.; VERHOEF, J. C.; DE SOUSA, A.; JUNGINGER, H. E.. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. International Journal of Pharmaceutics. 2005, v. 299, p. 155-166.

BRUMMER, E; CASTANEDA, E; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin. Microb. Rev., v. 6, p. 89-117. 1993.

CALEGARO JUM. Acompanhamento terapêutico da paracoccidioidomicose por imagens com Ga-67. Arq Bras Med. 1994; 68(6):381-5.

CALICH, V.; VAZ, C. & BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Research in Immunology, 1998, 149(4-5):407–417.

CALICH, V.L; PINA, A; FELONATO, M; BERNARDINO, S; COSTA T.A, LOURES, F.V. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis: FEMS Immunol Med Microbiol, (2008), v. 53, p. 1-7.

CARMONA-RIBEIRO, A.M; Cationic Nanostructures for Vaccines-Immune Response Activation, Dr. Ht Duc (Ed.), InTech, 2014. Available from: <http://www.intechopen.com/books/immune-response-activation/cationic-nanostructures-for-vaccines>.

CARVALHAES, M.S., DA SILVA, W.D., BIRMAN, E.G., SANT'ANNA, O.A, ABRAHAMSOHN, P. E KIPNIS, T.L. Experimental paracoccidioidomycosis in high and low antibody-producer mice. I.--Evolution of the disease, its correlation with the humoral immune response and the patterns of tissue lesions. Ann Inst Pasteur Immunol 1986, 137C, 127-41.

CELIS, E. Getting peptide vaccines to work: just a matter of quality control? Journal of Clinical Investigation, 2002, 110(12):1765–1768.

CISALPINO, P. S; PUCCIA, R; YAMAUCHI, L.M; CANO, M.I; da SILVEIRA, J.F. E; TRAVASSOS L.R. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. Biol Chem, 1996, 23;271(8):4553-60.

CORREA, M.; BEDOYA, A.; GUERRERO, M.; MÉNDEZ, J.; RESTREPO, A. & MCEWEN, J. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* Pb27 protein. Trends in Microbiology, 2006, 50:41–47.

CORREDOR, G. G., CASTAÑO, J. H., PERALTA, L. A., 1, DÍEZ, S., ARANGO, M., MCEWEN, J., RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. Rev Iberoam Micol 1999, 16: 216-220.

COUTINHO, Z. F.; DA SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; DE OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). Cadernos de Saúde Pública, 2002, 18(5). p. 1441-1454.

DINIZ, S.N; REIS, B.S; GOES, T.S; ZOUAIN, C.S; LEITE, M.F; GOES, A.M, Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine*, 2004, v. 22, p. 485-92.

FELIPE, M. S. S.; ANDRADE, R. V.; ARRAES, F. B. M.; NICOLA, A. M.; MARANHÃO, A. Q.; TORRES, F. A. G.; SILVA-PEREIRA, I.; POÇAS-FONSECA, M. J.; CAMPOS, E. G.; MORAES, L. M. P.; ANDRADE, P. A.; TAVARES, A. H. F. P.; SILVA, S. S.; KYAW, C. M.; SOUZA, D. P.; NETWORK, P.; PEREIRA, M.; JESUÍNO, R. S. A.; ANDRADE, E. V.; PARENTE, J. A.; OLIVEIRA, G. S.; BARBOSA, M. S.; MARTINS, N. F.; FACHIN, A. L.; CARDOSO, R. S.; PASSOS, G. A. S.; ALMEIDA, N. F.; WALTER, M. E. M. T.; SOARES, C. M. A.; CARVALHO, M. J. A. & BRÍGIDO, M. M.. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *The journal of biological chemistry*, 2005, 280(26):24706–24714.

FERNANDES V. C.; MARTINS E.M.N.; BOELONI J.N.; COITINHO J.B.; SERAKIDES R.; GOES A. M. Additive Effect of rPb27 Immunization and Chemotherapy in Experimental Paracoccidioidomycosis. *PLoS ONE*, 2011b, v. 6, p. e17885.

FERNANDES VC, COITINHO JB, VELOSO JMR, ARAUJO SA, PEDROSO EP, GOES AM. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Journal of Immunological Methods*, 2011c, 78–84

FERNANDES, V. C.; MARTINS, E. M.; BOELONI, J. N.; COITINHO, J. B.; SERAKIDES, R.; GOES, A. M. The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis: *Microbes Infect*, 2011a, v. 13, p. 1062-1072.

FORTES, M.P.R; MIOT, H.A; KUROKAWA, C.S; MARQUES, M.E.A; MARQUES, S.A. An Bras Immunology of paracoccidioidomycosis *Dermatol*. 2011, 86(3):516-25.

FRANK, R. The spot-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports? principles and applications. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 267:13– 26.

FRIEDMAN, A. J.; PHAN, J.; SCHAIRER, D. O.; CHAMPER, J.; QIN, M.; PIROUZ, A.; BLECHER- PAZ, K.; OREN, A.; LIU, P. T.; MODLIN, R. L. & KIM, J. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan?alginate nanoparticles: A targeted therapy for cutaneous pathogens. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013, 133:1231–1239.

GARCIA FUENTES, M. & ALONSO, M. J. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? *Journal of Controlled Release*, 2012, 161:496–504.

GOES A. M., LÍLIAN DA SILVA SANTOS L. S. , ARAÚJO, S. A., CRUZ, S. G., SIQUEIRA, W. C., PEDROSO, E. R. P. Paracoccidioidomycose (doença de Lutz-Splendore-Almeida): etiologia, epidemiologia e patogênese. *Rev Med Minas Gerais* 2014; 24(1): 61-66

GOY, R.C; BRITTO, D de; ASSIS, O.B.G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos/SP. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 2009, 9,3, 241-247,

GROSSO, D. M.; DE ALMEIDA, S. R.; MARIANO, M. & LOPES, J. D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. Infection and Immunity, 2003, 71(11):6534–6542.

HAMDAN JS, ROCHA RI. Epidemiologia da Paracoccidioidomicose. An Fac Med UFMG.1987;36(1/2):52-61.

HE, Y. & XIANG, Z. Databases and in silico tools for vaccine design. Em Kortagere, S., editor, In Silico Models for Drug Discovery, Methods in Molecular Biology, 2013, v 993, pp. 115–126.

HOTEZ PJ, BOTTAZZI ME, FRANCO-PAREDES C, AULT SK, PERIAGO MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a Road map for control and elimination. Plos Negl Trop Dis. 2008; 2(9):e300.

IRVINE, D. J.; SWARTZ, M. A. & SZETO, G. L. Engineering synthetic vaccines using cues from natural immunity? Nature Materials, 2013, 12(12):978–990.

JACKSON, D. C.; CHUA, B. Y. & ZENG, W. Totally synthetic peptide-based vaccines that target dendritic cells and induce potent antibody or ctl responses. International Congress Series, 2006, 1289:311–315.

KAFETZOULOS, D; MARTINOV, A; BOURIOTIS, V. Chitin Enzymology; European Chitin Soc: Ancona, 1993, p. 147.

KANETSUNA F, CARBONELL LM, AZUMA I, YAMAMURA Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Bacteriol 1972, 110:208–18.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L.; MORENO, R. & RODRIGUEZ, J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. Journal of Bacteriology, 1969, 97(3):1036–1041.

LACAZ, C. S. Tratado de micologia médica: São Paulo, 2002,Sarvier.

LACAZ, C.S. Morfologia, ciclo evolutivo, manutenção em vida saprofítica, biologia, virulência, posição sistemática. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM. Paracoccidioidomicose Blastomicose Sul Americana São Paulo, Sarvier, 1982, cap. 2, 11-21.

LACAZ, C.S. Paracoccidioidomicose. In: Del Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Micologia Médica. 8 ed. São Paulo, Sarvier, cap. 1991, 13, 248-297.

LARANJEIRA, M.C.M; de FÁVERE, V.T. Chitosan: functional byopolymer with biomedical industrial potential. Quím. Nova, 2009, 32-3.

LAUNE, D.; MOLINA, F.; FERRIERES, G.; VILLARD, S.; BES, C.; RIEUNIER, F.; CHARDES, T.; GRANIER, C. Application of the spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of Immunological Methods*, 2002, v. 267, p. 53-70.

LEE, S; NGUYEN, M. T. Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases. *Immune Network*, 2015, 15, 2: 51-57.

LI, X; MIN, M; DU, N; GU, Y; HODE, T; NAYLOR, M; CHEN, D; NORDQUIST, RE; CHEN, W.R; Chitin, chitosan, and glycated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. *Clin Dev Immunol*. 2013, 1-8.

LIU, J.; LIU, S. & CAO, X. Highlights of the advances in basic immunology in 2011. *Cellular and Molecular Immunology*, 2012, 9:197–207.

LONDERO AT, MELO IS. Aula 13: Paracoccidioidomicose. *J Bras Med*. 1998; 55(3):98-111.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localisada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Brasil Med*, 1908, 22:121–124.

LYON AC, TEIXEIRA MM, ARAÚJO SA, PEREIRA MC, PEDROSO ER, TEIXEIRA AL. Serum levels of sTNF-R1, sTNF-R2 and CXCL9 correlate with disease activity in adult type paracoccidioidomycosis. *Acta Trop*. 2009; 109(3):213-8.

MACHADO DE AVILA, R. A.; ALVARENGA L. M.; TAVARES, C. A. P.; MOLINA, F.; GRANIER, C; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon*. 2004, v. 44, p. 233-241.

MACHADO DE AVILA, R. A.; STRANSKY, S.; VELLOSO, M.; CASTANHEIRA, P.; SCHNEIDER, F. S.; KALAPOTHAKIS, E.; SANCHEZ, E. F.; C. NGUYEN F. MOLINA AND, C. G.; CHAVEZ OLORTEGUI, C. Mimotopes of mutalysin-II from lachesis muta snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. *Peptides*, 2011, v. 32, p. 1640-1646.

MARTINEZ R. Paracoccidioidomicose: epidemiologia e ecologia. In: Veronesi R, Focaccia R, editores. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 1080-3.

MARTINEZ R. Paracoccidioidomycosis: The dimension of the problem of a neglected disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43:480.

MARTINS, E. M. D. N., B. S. REIS, M. A. DE RESENDE, A. S. DE ANDRADE, AND A. M. GOES. Mice immunization with radioattenuated yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*: influence of the number of immunizations. *Mycopathologia*, 2009, v. 168, p. 51-8.

MATUTE, D. R.; MCEWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NIÑO-VEGA, G. & TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol*, 2006, 23:65–73.

MCEWEN, J. G.; ORTIZ, B. L.; GARCÍA, A. M.; FLOREZ, A. M.; BOTERO, S. & RESTREPO, A. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kda antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. Fungal Genetics and Biology, 1996, 20:125–131.

MENDES RP, SHIKANAI-YASUDA MA. Paracoccidioidomicose. In: Cimerman S, Cimerman B. Medicina Tropical. São Paulo: Atheneu; 2003. p.505-45.

MENDES RP. Paracoccidioidomicose. In: Rocha MOC, Pedroso ERP. Fundamentos em Infectologia. Rio de Janeiro: Rubio; 2009. p. 945-94.

MENEZES VM, SOARES BG, FONTES CJ. Drugs for treating paracoccidioidomycosis. Cochrane Database Syst Rev. 2006; 1:CD004967.

MENINO J.F; SARAIVA M; GOMES-ALVES A.G; LOBO-SILVA D; STURME M; GOMES- REZENDE J; SARAIVA A.L; GOLDMAN G.H; CUNHA C; CARVALHO A; ROMANI L; PEDROSA J; CASTRO A.G, RODRIGUES F. TLR9 activation dampens the early inflammatory response to *Paracoccidioides brasiliensis*, impacting host survival. Plos Negl Trop Dis. 2013, 25; 7(7):e2317.

MERRIFIELD, R. B. The synthesis of biologically active peptides and proteins. The Journal of American Medical Association. 1969, v. 210, p. 53-70.

MORAIS E.A, CHAME D.F, MELO E.M, OLIVEIRA J.A de C, PAULA A.C de, PEIXOTO A.C, SANTOS L da S, GOMES D.A, RUSSO R.C, de GOES A.M. TLR 9 involvement in early protection induced by immunization with rPb27 against Paracoccidioidomycosis. Microbes Infect. 2015, S1286-4579 (15)00228-2.

MORAIS, E.A; MARTINS, E.M; BOELONE, J.N; GOMES, D.A; GOES A.M. Immunization with recombinant Pb27 protein reduces the levels of pulmonary fibrosis caused by the inflammatory response against *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycopathologia. 2015, 179(1-2):31-43.

MOREIRA APV. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. Bol Epidemiol Paulista. 2008; 5(51).

NOGUEIRA MGS, ANDRADE GMQ, TONELLI E. Aspectos laboratoriais evolutivos de crianças em tratamento da paracoccidioidomicose. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39:478-83.

OLIVEIRA, C. R.; REZENDE, C. M. F.; SILVA, M. R.; PÊGO, A. P.; BORGES, O. & GOES, A. M. A new strategy based on Smrho protein loaded chitosan nanoparticles as a candidate oral vaccine against schistosomiasis. Plos Neglected Tropical Diseases, 2012, 6:e1894.

PANIAGO AMM, AGUIAR JIA, AGUIAR ES, CUNHA RV, PEREIRA GROL, LONDERO AT, *et al.*. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no estado de Mato Grosso do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2003, 36(4):455-9.

PEDROSO ERP, VELOSO JMR, PRADO LGR. Saúde pública e epidemiologia: a paracoccidioidomicose em pacientes atendidos no Hospital das Clínicas (HC-UFMG). In: 3º Congresso Mineiro de Infectologia, 2008, Belo Horizonte. A paracoccidioidomicose em pacientes atendidos no Hospital das Clínicas (HC-UFMG). Belo Horizonte: HC-UFMG; 2008.

PEDROSO VSP, VILELA MC, PEDROSO ERP, TEIXEIRA AL. Paracoccidioidomycosis compromising the central nervous system: a systematic review of the literature. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42:691-7.

PEREIRA RM, TRESOLDI AT, SILVA MTN, BUCARETCHI F. Fatal disseminated paracoccidioidomycosis in a two-year-old child. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2004; 46(1):37-9.

PINZAN, C. F; RUAS, L.P; CASABONA-FORTUNATO, A. S; CARVALHO F.C, ROQUE- BARREIRA, M.C. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection: Plos One, 2010, v. 5, p. e10757.

RAAFAT, D; VON BARGEN, K; HAAS, A; SAHL, H.G. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. Appl Environ Microbiol. Jun; 2008, 74(12): 3764–3773.

REIS, B.S; FERNANDES, V.C; MARTINS, E.M; SERAKIDES, R; GOES A.M. Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. Vaccine, 2008, v. 26, p. 5461-9.

RESTREPO-MORENO, A. Paracoccidioidomycosis. In: Fungal Infections and Immune Responses, 1993, 251-276.

RESTREPO, A.; GONZALEZ, A. & AGUDELO, C. A. Paracoccidioidomycosis. Essentials of Clinical Mycology, 2011, pp. 367–385.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. & CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? Med Mycol, 2001, 39(3):233–241.

ROUGET, M. C. Des substances amylacées dans les tissus des animaux, spécialement des Articulés (chitine). Comp. Rend. 1859, 48:792-795,.

SAENZ, L; NEIRA-CARRILLO, A; PAREDES, R; CORTES, M; BUCAREY, S; ARIAS, J.L. Chitosan formulations improve the immunogenicity of a GnRH-I peptide-based vaccine. Int. J. Pharm. 2009, 369, 64–71.

SAHA, S. & RAGHAVA, G. P. S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. Proteins. 2006, v. 65, p. 40-48.

SAHA, S.; BHASIN, M. & RAGHAVA, G. P. Bcipep: A database of B-cell epitopes. BMC Genomics, 2005, 6:79.

SAN-BLAS, G., NINO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: Cihlar RL, Calderone RA, editors. Fungal pathogenesis: principles and clinical applications 2001, New York: Marcel Dekker.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. *Mycopathologia*, 1977; 62: 77-86.

SAN-BLAS, G., SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: *Fungal Dimorphism* (Szaniszlo, P., ed.). Plenum Press 1985, New York, NY, USA, 93.

SANTOS, L.D.S; FERNANDES,V.C; CRUZ,S.G; SIQUEIRA,W.C; GOES, A.M; PEDROSO,E.R. Profile of total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 levels in sera of patients with paracoccidioidomycosis: treatment follow-up using Mexo and rPb27 as antigens in an ELISA: *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2012, v. 107, p. 1-10.

SHIKANAI-YASUDA, MA; TELLES FILHO, FQ; MENDES, RP. *et al.* Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2006, v. 39, p. 297-310.

SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEON, D. E. & PONCE-DELEON, L. A. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep*, 2012, 6:23–34.

SIMITSEK, P. D.; CAMPBELL, D. G.; LANZAVECCHIA, A.; FAIRWEATHERFL, N. & WATTS, C. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *Journal of Experimental Medicine*, 1995, 18(6):1957–1963.

SINGH, H. & RAGHAVA; G. ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics*, 2001, v. 17, p. 1236-1237.

SMITH, A; PERELMAN, M; HINCHCLIFFE, M. Chitosan: a promising safe and immune- enhancing adjuvant for intranasal vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2014, 10(3):797-807.

SOARES A.M; PERASOLI M.T; SANTOS R.R.dos. Correlation among immune response, morphogenesis of the granulomatous reaction and spleen lymphoid structure in murine experimental paracoccidioidomycosis. *Medical mycology*, 2000, vol.38, ed.5; 371-7,

STURNIOLO T.; BONO E.; DING J.; RADDRIZZANI L.; TUERECI O.; SAHIN U.; BRAXENTHALER M.; GALLAZZI F.; PROTTI M.P.; SINIGAGLIA F.; HAMMER J. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nature Biotechnol.* 1999, v. 17, p. 555-561.

STURNIOLO, T.; BONO, E.; DING, J.; RADDRIZZANI, L.; TUERECI, O.; SAHIN, U.; BRAXENTHALER, M.; GALLAZZI, F.; PROTTI, M. P.; SINIGAGLIA, F. & HAMMER, J. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nature Biotechnology*, 1999, 17:555–561.

TABORDA C.P, URÁN M.E, NOSANCHUK J.D, TRAVASSOS, L.R. Paracoccidioidomycosis: challenges in the development of a vaccine against an endemic mycosis in the Americas. *Rev. Inst. Med. trop.* 2015. 57 (19).

TABORDA, C. P.; JULIANO, M. A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; & TRAVASSOS, L. R. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in balb/c mice. *Infection and Immunity*, 1998, 66(2):786–793.

TEIXEIRA MM, THEODORO RC, OLIVEIRA FF, MACHADO GC, HAHN RC, BAGAGLI E, SAN-BLAS G, SOARES FELIPE MS. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol*. 52(1):19-28,2014.

THEODORO RC, TEIXEIRA MDM, FELIPE MSS, PADUAN KDS, RIBOLLA PM, SAN-BLAS G, BAGAGLI, E. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e37694.

TOMAZETT, P. K.; DA SILVA CRUZ, A. H.; BONFIM, S. M. R. C.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. & PEREIRA, M. The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. *Genetics and Molecular Research*, 2005, 4(2):309–325.

TRAVASSOS, L. R. & TABORDA, C. P. New advances in the development of a vaccine against paracoccidioidomycosis. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3(212):1-6.

UNTERKIRCHER, C. S; LEÃO, M.V.P; BLOTTA, M. H. S. L ; CAMARGO, Z.P.D, Natural Antibodies In Paracoccidioidomycosis: *Brazilian Journal of Microbiology*, 2004.

VAN REGENMORTEL, M.H. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals*, 2001; 29(3-4):209-213.

VIBHU KANCHAN, A. K. P. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials*, 2007, 28(35):5344–5357.

VISBAL G, SAN-BLAS G, MURGICH J, FRANCO H. *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2005; 5:211-226.

WEN, Z; XU, Y; ZOU, X; XU, Z. Chitosan nanoparticles act as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice. *Marine Drugs*, 2011, 9:1038–1055.

WUCHERPFENNIG, K. W.; CATZ, I.; HAUSMANN, S.; STROMINGER, J. L. & WARREN, L. S. K. G. Recognition of the immunodominant myelin basic protein peptide by auto- antibodies and HLA-DR2-restricted T cell clones from multiple sclerosis patients. identity of key contact residues in the B-cell and T-cell epitopes. *Gut*, 1997, 100(5):1114– 1122.

ZAHAROFF, D.A; ROGERS, C.J; HANCE, K.W; SCHLOM, J; GREINER, J.W. Chitosan solution enhances the immunoadjuvant properties of GM-CSF. *Vaccine*, 2009, 25, 8673– 8686.

ZHU, B; QIE, Y; WANG, J; ZHANG, Y; WANG, Q; XU, Y; WANG, H. Chitosan microspheres enhance the immunogenicity of an Ag85B-based fusion protein containing multiple T-cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2007, 66,318–326.

ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 359 / 2012, relativo ao projeto intitulado "Atividade terapêutica do híbrido nanoestruturado de carbono, quitosana e epítomos preditos da proteína Pb27r na paracoccidioidomicose.", que tem como responsável Alfredo Miranda Góes, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 17/05/2016. Este certificado espira-se em 17/05/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 359 / 2012, related to the Project entitled "Therapeutic activity of nanostructured hybrid carbon, chitosan and predicted epitopes Pb27r protein in paracoccidioidomycosis.", under the supervision of Alfredo Miranda Góes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 17/05/2016. This certificates expires in 17/05/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 17/05/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

	Universidade Federal de Minas Gerais Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP
--	--

Parecer nº. ETIC 523/07

Interessado(a): Prof. Alfredo Miranda de Goes
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 28 de novembro de 2007, o projeto de pesquisa intitulado **"Clonagem e caracterização das proteínas Kinesina e pb40r presentes na fração protetora F0 de Paracoccidioides brasiliensis"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG