

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

**Direcionamento de antígenos para células dendríticas *in vivo*: uma  
nova estratégia para o desenvolvimento de vacina na  
paracoccidiodomicose.**

**Suelen Silvana dos Santos**

Tese apresentada para obtenção do  
grau de DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo  
2014

Suelen Silvana dos Santos

Direcionamento de antígenos para células dendríticas *in vivo*: uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacina na paracoccidiodomicose.

Versão original

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida  
orientador/presidente

---

1o. examinador

---

2o. examinador

---

3o. examinador

---

4o. examinador

São Paulo, 2014.

*Eu dedico este trabalho aos meus pais  
Heleni e Waldomiro,  
e ao Marcus,  
pelo apoio, carinho, compreensão e  
por todo amor a mim dedicados.*

## *Agradecimentos*

*À Deus.*

*“Aquilo que somos é um presente de Deus para nós. Aquilo que nos tornamos é o nosso presente para Deus” (Eleanor Powell).*

*Obrigada por me dar o suficiente para que eu chegasse até aqui hoje.*

*À minha família.*

*“Porque eu sei que é amor  
Eu não peço nada em troca  
Porque eu sei que é amor  
Eu não peço nenhuma prova  
Mesmo que você não esteja aqui  
O amor está aqui agora  
Mesmo que você tenha que partir  
O amor não há de ir embora”*

*Aos meus pais Waldomiro e Heleni. Vocês foram meus primeiros professores, me ensinaram a andar, falar, ler e escrever. Vocês estiveram sempre ao meu lado, embora nem sempre concordassem com as minhas decisões, me apoiaram, me ouviram, me ajudaram. É impossível imaginar ter chegado ao fim dessa jornada sem o extenso apoio que recebi de vocês.*

*Às minhas irmãs Silvia e Taís e ao meu irmão Vinícius, com cada um de vocês experimentei a sensação de ser amada, e de dar amor de maneira incondicional. Obrigada pelos ensinamentos desde pequenininha, e por me deixarem ser a tia Shu, dos meus tão amados pequenos Heloísa, Camila, Lívia e Raul. Aos cunhados Marcelo, Ércules e Larissa, por completarem a família.*

*Aos tios, tias, primos e primas, dos quais eu sinto muita falta aqui nessa cidade, falta das festas em família, dos domingos alegres, das palhaçadas em família.*

*Aos meus avôs José e Bento e avós Maria e Joana pelos grandes exemplos de vida que foram, todo meu carinho, respeito e admiração serão eternos.*

*As famílias Camillo e Oliveira, pelo acolhimento, por me deixarem fazer parte de suas vidas.*

*Ao Marcus Vinnicius Camillo de Oliveira*

*“So close no matter how far  
Couldn't be much more from the heart  
Forever trusting who we are  
And nothing else matters  
Trust I seek and I find in you  
Every day for us something new  
Open mind for a different view  
And nothing else matters  
Never cared for what they do  
Never cared for what they know  
But I know”  
Metallica*

*Ao meu amor Marcus, que me acompanhou desde o início, me encorajou quando necessário, me animou quando as coisas não pareciam dar certo, me apoiou nos meses que estive longe, se fazendo presente mesmo na grande distância. Suas críticas, sua força, sua maneira lógica de encarar as coisas, e principalmente seu amor, foram extremamente importantes nesses quatro anos de doutorado.*

*Aos amigos*

*“Foi bem cedo na vida que eu procurei  
Encontrar novos rumos num mundo melhor  
Com você fique certo que jamais falhei  
Pois ganhei muita força tornando maior  
A amizade  
Nem mesmo a força do tempo irá destruir  
Somos verdade  
Nem mesmo este samba de amor pode nos resumir  
Quero chorar o seu choro  
Quero sorrir seu sorriso  
Valeu por você existir, amigo”  
Fundo de quintal*

*Sou muito grata a todos os amigos que possuo, e são vários e verdadeiros. Listá-los seria correr o risco de deixar alguém de fora, pois essa jornada não começou há quatro anos, mas é fruto de sonhos de uma vida toda. E dessa forma, todos os amigos foram importantes, os de infância, os primos-amigos, os irmãos-amigos, os amigos-irmãos, os do colégio, da faculdade, e os conquistados mais recentemente em São Paulo. Com certeza qualquer caminho ao lado de bons amigos é mais leve e mais gostoso.*

## *Aos amigos da Universidade de São Paulo*

*Ao Professor Doutor Sandro Rogério de Almeida, que me orientou nesse trabalho, compartilhou comigo seu conhecimento, e pela confiança em mim depositada.*

*À Karen Spadari Ferreira, por seu incentivo, seu tempo investido em discussões, e também pelos momentos de descontração.*

*À Silvia Beatriz Boscardin, pelo espaço cedido em seu laboratório, pelos ensinamentos, pela orientação e enorme colaboração nesse trabalho.*

*Ao Carlos Pelleschi Taborda, pela colaboração nesse trabalho.*

*Aos amigos do laboratório de Micologia, Lucas Gonçalves Ferreira, Fábio Yoshikawa, Luana Rossato, Grasielle Pereira Januzzi, José Roberto Fogaça de Almeida, Lavínia Maria Romera, Leandro Breda, Pollyana Martins, Nicole Araújo, e agregado Gilberto Kaihama, pelo companheirismo, com os quais pude dividir minhas angústias, dúvidas, erros e acertos, ensinando e aprendendo com eles.*

*À Sonia Caramico Buratto, técnica do laboratório, Edna, Sueli, Dora e principalmente à Ana, pela paciência e ajuda nas questões burocráticas relacionadas a este trabalho. À Rose e Claudinha, por todo o café e risadas nos corredores.*

*Aos amigos do laboratório de Direcionamento de Antígenos, Kelly Amorin, Raquel Panatieri, e em especial a Eline Rampazo e Márcio Yamamoto, que me auxiliaram na construção e caracterização dos anticorpos quiméricos.*

*Aos amigos do Departamento de Análises Clínicas, em especial à Hadassa Cristina Santos, Francielle Hinterolz Knebel, Edson de Oliveira, Renato Massaro, Renata Albuquerque, pelo companheirismo, auxílio e risadas compartilhadas.*

*A todos que de alguma maneira, contribuíram para a realização desse trabalho.*

***Muito obrigada!!***

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## RESUMO

Santos, S.S. **Direcionamento de antígenos para células dendríticas *in vivo*: uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacina na Paracoccidioidomicose.** Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica mais frequente no Brasil. Na última década, foi demonstrado que é possível enviar antígenos diretamente para as células dendríticas utilizando o anticorpo  $\alpha$ DEC205 e na presença de um estímulo de maturação, o resultado é a indução de uma resposta imunológica. Verificamos que o anticorpo  $\alpha$ DEC fusionado ao peptídeo P10 induziu uma resposta por células produtoras de IFN- $\gamma$  após uma única dose em relação à administração de P10, mesmo tendo sido administrado em uma concentração menor. Entretanto, essa resposta não se manteve após segunda dose do anticorpo. Após desafio dos animais com *P. brasiliensis*, imunizados com duas doses do anticorpo quimérico, detectamos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-4 no tecido pulmonar estatisticamente maiores no grupo  $\alpha$ DEC/P10 e ISO/P10 em relação à administração de P10, todos em presença de Poly I:C. Em ensaios de terapia, verificamos no pulmão de camundongos tratados com o anticorpo quimérico, principal órgão envolvido em modelo animal de PCM, baixa concentração de IFN- $\gamma$  e IL-10 em relação aos controles. Em adição, ficou evidente que nos animais tratados com o anticorpo  $\alpha$ DEC/P10 o tecido pulmonar está compatível com o tecido de animais não infectados, enquanto que na ausência de tratamento adequado encontramos aglomerados de leveduras e um tecido com aumento no infiltrado celular. Esses achados indicam uma boa evolução clínica em animais tratados e indicam que o direcionamento do P10 através do anticorpo quimérico  $\alpha$ DEC/P10, na presença de Poly I:C, é uma estratégia promissora para terapia contra *P. brasiliensis*.

Palavras- Chaves: Paracoccidioidomicose, células dendríticas, DEC-205, vacinação, terapia.

## ABSTRACT

Santos, S.S. **Targeting antigens to dendritic cells in vivo: a new strategy for vaccine development in Paracoccidioidomycosis.** Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most common systemic mycosis in Brazil. In the last decade, it was demonstrated that antigens can be directly target to the dendritic cells using the antibody  $\alpha$ DEC205 in the presence of a maturation stimulus, resulting in the induction of a strong immune response. We found that  $\alpha$ DEC205 antibody fused to peptide P10 induced great response by IFN- $\gamma$  producing cells after a single dose in relation to the administration of P10, although it has been administered in a lower concentration. However, this response was not maintained after second dose of antibody. Animals challenge with *P. brasiliensis*, after immunization with two doses of the chimeric antibody, produced high levels IFN- $\gamma$  and IL-4 in lung tissue significantly higher in  $\alpha$ DEC/P10 group in relation to the administration of P10, all in the presence of Poly I:C. In therapy assays, we found in the lungs of mice treated with the chimeric antibody, the main organ involved in an animal model of PCM, low concentration of IFN- $\gamma$  and IL-10 compared to controls. In addition, it became evident that animals treated with  $\alpha$ DEC/P10 antibody have a lung tissue much closer to that of non-infected tissue, while in the absence of suitable treatment we find clusters of yeasts and tissue filled with cellular infiltrates. Altogether, these findings show a clinical improvement in treated animals and indicate that targeting of P10 through the chimeric antibody  $\alpha$ DEC/P10 in the presence of Poly I:C, is a promising strategy for therapy against *P. brasiliensis*.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; dendritic cells; DEC-205; vaccination; therapy.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrometro
A	Adenina
ACF	Adjuvante completo de Freund
AEC	3-Amino-9-etilcarbazol
AID GmbH	<i>Autoimmun Diagnostika GmbH</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> (Célula apresentadora de antígeno)
B220	<i>220 kDa surface molecule</i> (Molécula de superfície de 220kDa)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de Cérebro e Coração)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i> (Quimiocina ligante)
CCR7	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 7</i> (Receptor 7 de quimiocina)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupamento de diferenciação)
cDC	<i>Conventional dendritic cell</i> (Célula dendrítica convencional)
cDNA	<i>complementary DNA</i> ( DNA complementar )
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
ConA	Concanavalina A
CSP	Circunsporozoíta
DC	<i>Dendritic cell</i> (Célula dendrítica)
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DEC-205	<i>CD205 - Cluster of differentiation 205</i> (Grupamento de diferenciação 205)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
Dntp	<i>Deoxyribonucleotide triphosphates</i> (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados)
DP	Desvio padrão

dT	Deoxi-timina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
ELISPOT	<i>Enzyme-Linked ImmunoSpot</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated Fluorescence Assisted Cell Sorting</i> (Separador de células por fluorescência ativada)
Fc	Fragmento cristalizável
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
g	Giros
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)
gp	Glicoproteína
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
hDEC-205	<i>human DEC-205</i> (DEC-205 humano)
HEK 293	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i> (Células de rim de embrião humano 293)
HIV	Human Immunodeficiency vírus (Vírus da imunodeficiência humana)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Peroxidase de raiz forte)
i.t.	Intra-traqueal
ICAM-3	<i>Intercellular adhesion molecule-3</i> (Molécula de adesão intercelular-3)
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL-	Interleucina
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranoside
ISO	Isotipo
kg	Quilograma
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MDA-5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i> (Madin-Darby de rim canino)
mg	Miligrama

MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
Min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
MR	<i>Mannose Receptor</i> (Receptor de Manose)
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i> (Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico)
MSP1	<i>Merozoite surface protein-1</i> (Proteína da superfície de merozoítos)
n	Número
ng	Nanograma
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
Not I	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
°C	Graus Celcius
OVA	Ovalbumina
P10	Peptídeo 10
p24	Proteína de 24 kilodaltons
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados a patógenos)
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
pb	Pares de bases
PBMC	<i>Peripheral blood mononucleated cell</i> (Células mononucleares de sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
PCM	Paracoccidioidomicose
pDC	<i>Plasmacytoid dendritic cell</i> (Célula dendrítica Plasmocitóide)
PE	<i>Phycoerythrin</i> (ficoeritrina)
PEI	Polietilenimina
PerCP CY5.5	<i>Peridinin-chlorophyll proteins conjugate with cyanine 5.5</i> (proteína Piridina com clorofila conjugada a cianina 5.5)
pg	picogramas
pH	Potencial hidrogeniônico

PLGA	<i>Poly(lactic-co-glycolic acid)</i> ( Poli(ácido lactico-co-glicólico))
PMN	Polimorfonucleares
Poly I:C	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> (Receptor de reconhecimento de padrões)
PS2	<i>Phylogenetic species 2</i> (Espécie filogenética 2)
PS3	<i>Phylogenetic species 3</i> (Espécie filogenética 3)
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> (Fluoreto de polivinilideno)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
s	Segundos
S1	<i>Species 1</i> (Espécie 1)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil-sulfato de sódio)
SFB	Soro fetal bovino
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
SPF	<i>Specific-pathogen-free</i> (Livre de patógenos específicos)
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i> (Citrato de sódio salino)
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Th	<i>T helper</i> (T auxiliar)
TLR	<i>Toll-like receptors</i> (Receptores do tipo Toll)
TNF-R	<i>Tumor necrosis factor receptor</i> (Receptor do fator de necrose tumoral)
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alfa</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
U	Unidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	Universidade de São Paulo
V	Volts
VERO	<i>Kidney epithelial cells from African Green Monkey</i> (Células epiteliais do rim do macaco verde africano)
W	Watts
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranoside

κ

kappa

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto microscópico de <i>P. brasiliensis</i> ..	22
Figura 3. Crianças apresentando a forma aguda da paracoccidiodomicose..	26
Figura 4. Jovens com a forma aguda/subaguda (tipo juvenil) da paracoccidiodomicose. ....	26
Figura 6. Vetor de clonagem e sub-clonagem. ....	49
Figura 7. RT-PCR para amplificação da sequência correspondente a gp43e purificação da banda contendo o DNA de interesse.....	62
Figura 9. Análise de restrição utilizando as enzimas XhoI e NotI. ....	64
Figura 10. Purificação do inserto liberado após análise de restrição com as enzimas XhoI e NotI.....	64
Figura 11. RT-PCR para amplificação da sequência correspondente a porção anterior e posterior ao intron na gp43.....	65
Figura 12. RT-PCR para amplificação da sequência correspondente a gp43 sem o íntron. ....	65
Figura 13. Representação esquemática da sequência codificante do gene da gp43 clonada em vetor pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO.....	67
Figura 16. Análise de restrição dos clones utilizando as enzimas Xho I e Not I. ....	69
Figura 17. Análise da integridade dos anticorpos em gel de SDS-PAGE em condições redutoras seguido de coloração por Azul de Coomassie. ....	70
Figura 20. Purificação de DNA plasmidial por cromatografia de troca iônica em coluna após transformação bacteriana com produto de ligação da sequência de DNA do P10 em fusão com as seqüências dos anticorpos anti-DEC 205 e seu controle isotípico.....	73
Figura 21. Análise de restrição utilizando as enzimas NheI e NotI. ....	74
Figura 22. Ensaio de ligação do anticorpo $\alpha$ DEC205/P10 em células de baço de camundongos C57Bl/6 naive. ....	75
Figura 23. Células produtoras de IFN- $\gamma$ detectadas 10 dias após imunização de animais BALC/c com anticorpos quiméricos..	77
Figura 24. Células produtoras de IFN- $\gamma$ em animais imunizados com anticorpos quiméricos, em ensaios de <i>prime</i> e <i>boost</i> . ....	77
Figura 26. Produção de IFN- $\gamma$ e IL-4 em fígado de animais imunizados e desafiados com <i>P. brasiliensis</i> .....	80
Figura 28. Níveis de citocinas produzidas pelo baço de camundongos BALB/c infectados com <i>P. brasiliensis</i> e tratados com anticorpos quiméricos. ....	83

Figura 29. Níveis de citocinas produzidas pelo fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>P. brasiliensis</i> e tratados com anticorpos quiméricos.....	84
Figura 31. Redução do infiltrado inflamatório pulmonar em camundongos infectados com <i>P. brasiliensis</i> e tratados com $\alpha$ DEC/P10.....	87

## Sumário

I. Introdução.....	20
A Paracoccidiodomicose.....	21
As células dendríticas e os receptores DEC-205.....	34
Em busca de uma vacina eficiente contra <i>P. brasiliensis</i> : O peptídeo P10.....	38
A escolha do estímulo de maturação no direcionamento de antígenos na PCM.....	40
II. Objetivos.....	42
Objetivo Geral.....	43
Objetivos específicos.....	43
III. Material e métodos.....	44
1. Animais.....	45
1. Animais.....	45
2. Fungo.....	45
3. Isolamento de ácido ribonucleico (RNA) total de <i>P. brasiliensis</i> .....	45
4. Tratamento da amostra de RNA com DNase.....	46
5. Avaliação da qualidade do RNA por meio de eletroforese em gel de agarose.....	46
6. Síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA).....	46
7. Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT- PCR) para amplificação da sequência da gp43.....	47
8. Purificação da banda correspondente a seqüência da gp43 do gel de agarose.....	47
9. Adição de adenina (A) na extremidade 3' do cDNA.....	48
10. Vetores.....	48
11. Ligação da seqüência da gp43 no vetor pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO (TA Cloning Kit).....	49
12. Preparação de bactérias competentes para transformação.....	50
13. Transformação bacteriana por choque térmico.....	50
14. Seleção das colônias transformadas.....	50
15. Extração do DNA plasmidial para análise das colônias bacterianas.....	51
16. Hidrólise do DNA plasmidial com XhoI e NotI.....	52
17. Sequenciamento de DNA plasmidial.....	52
18. Estratégia para retirada do intron na seqüência da gp43.....	52
19. Anelamento de P10 contendo os sítios de restrição XhoI e NotI.....	53
20. Clonagem da seqüência de DNA da gp43 e da seqüência do P10 sintético em fusão com as seqüências dos anticorpos $\alpha$ DEC-205.....	53

21. Produção dos anticorpos quiméricos por transfecção transiente de células embrionárias de rim humano 293T (HEK 293T) e purificação dos mesmos à partir dos sobrenadantes das culturas. ....	54
22. Lise da parede celular para liberação dos anticorpos híbridos fusionados a gp43. ....	54
23. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE). ....	55
24. Reconhecimento de proteínas por <i>Western Blot</i> . ....	55
25. Ensaio de viabilidade dos anticorpos ....	56
26. Imunização dos animais com os anticorpos quiméricos fusionados ao P10. ....	56
27. Análise das células T CD4 <sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ de animais imunizados com anticorpos híbridos pela técnica de ELISPOT. ....	56
28. Detecção de citocinas a partir do sobrenadante de esplenócitos de animais imunizados e estimulados <i>in vitro</i> com o P10. ....	57
29. Preparo do inóculo de <i>P. brasiliensis</i> para desafio dos animais imunizados. ....	58
30. Desafio dos animais imunizados intratraquealmente com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> . ...	58
31. Terapia de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> utilizando anticorpos quiméricos. ....	58
32. Detecção de citocinas em baço, fígado e pulmão após ensaios de imunização e terapia. ...	59
33. Ensaio para determinação das Unidades Formadoras de Colônias em órgãos de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> e tratados com anticorpo quimérico $\alpha$ DEC/P10. ....	59
34. Análise histopatológica ....	60
35. Análise estatística. ....	60
IV. Resultados ....	61
Obtenção do DNA da gp43. ....	62
Clonagem em vetor pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO. ....	62
Estratégia para retirada do intron do clone 1.4 da gp43. ....	64
Sub-clonagem da sequência da gp43 em plasmídios que codificam a cadeia pesada dos anticorpos $\alpha$ DEC-205 e seu controle isotípico. ....	66
Expressão dos anticorpos híbridos ....	69
Caracterização do anticorpo $\alpha$ DEC205/gp43. ....	70
Clonagem do P10 em plasmídios que codificam a cadeia pesada dos anticorpos $\alpha$ DEC-205 e seu controle isotípico. ....	73
Caracterização do anticorpo $\alpha$ DEC205/P10. ....	74
Avaliação da resposta específica, através de células produtoras de IFN- $\gamma$ após imunizações com os anticorpos quiméricos. ....	76

Produção de citocinas em órgãos de animais imunizados com anticorpos quiméricos e desafiados com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> .....	78
Produção de citocinas em órgãos de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> e tratados com anticorpos quiméricos.....	81
Redução da carga fúngica em animais tratados com o anticorpo quimérico $\alpha$ DEC205/P10. ..	86
V. Discussão e Considerações .....	89
VI. Conclusões .....	94
VII.Referências Bibliográficas .....	96
VIII. Anexos .....	109
Parecer da Comissão de Ética no Uso Animais.....	110
Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Doutorado .....	111
Ficha do aluno .....	112
Currículo Lattes .....	115

# ***I. Introdução***

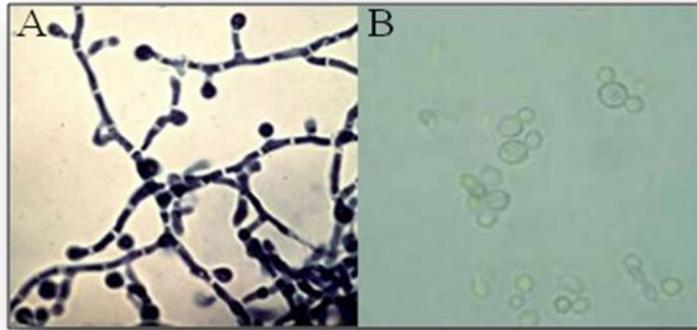
---

### **A Paracoccidioidomicose.**

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose profunda de natureza granulomatosa, que compromete preferencialmente o tecido pulmonar, o sistema linfático, o tecido mucocutâneo e, por contiguidade, qualquer outro órgão. A PCM foi descrita pela primeira vez em 1908 por Lutz, em pacientes apresentando granulomas ganglionares e com lesões na mucosa oral. Posteriormente, Splendore (1912) documentou quatro novos casos de PCM e em seu trabalho isolou o agente etiológico em cultura e classificou-o como *Zymonema brasiliensis*. Numerosas tentativas para classificar e nomear esse microrganismo seguiram-se até que Almeida (1930) criou o novo gênero *Paracoccidioides* e o fungo foi classificado como *Paracoccidioides brasiliensis*.

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* foram classificados em 1998 pela distribuição geográfica (CALGANO et al., 1998). Um estudo publicado em 2006, dividiu *P. brasiliensis* em três subtipos distintos: S1 (espécie 1; 38 isolados do Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela), PS2 (espécies filogenéticas 2, com seis isolados do Brasil e Venezuela) e PS3 (espécie filogenética 3, com 21 isolados da Colômbia) (MATUTE et al., 2006). No entanto, algumas pesquisas demonstraram a existência de isolados atípicos que não se encaixavam em nenhum dos grupos propostos, tendo ampla variabilidade genética, o que sugeria a possível existência de uma outra espécie. Em 2009, Teixeira et al., utilizando o método de reconhecimento de espécies filogenéticas pela concordância genealógica (GCPSR) analisou isolados de *P. brasiliensis* e propôs o agrupamento dos isolados atípicos (*Pb-01 like*) como a nova espécie *Paracoccidioides lutzii*. No entanto, a maioria dos estudos até o momento utilizaram isolados e cepas de *P. brasiliensis*, entre elas a cepa virulenta Pb18, que é amplamente conhecida.

O *Paracoccidioides* sp é um fungo dimórfico térmico, que cresce na forma micelial a temperatura ambiente de 25 °C a 27 °C, com colônias de aspecto cotonoso, de crescimento lento e, microscopicamente, apresenta hifas hialinas delgadas septadas (Figura 1A). Na forma de levedura, à 35 °C - 37 °C, o fungo cresce como colônia cerebriforme, que ao exame microscópico pode apresentar formas arredondadas ou ovaladas, de dupla parede refringente, multibrotantes, com aspecto morfológico característico de roda de leme e com diâmetro variável de 1-30 µm (LACAZ et al., 1991) (Figura 1B).



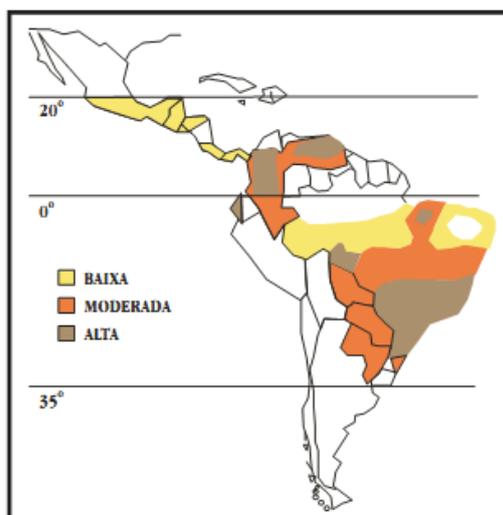
**Figura 1. Aspecto microscópico de *P. brasiliensis*.** A) *P. brasiliensis* na forma miceliana, cultivado a 37 °C. B) *P. brasiliensis*, na forma levedura, característica com brotamentos múltiplos em forma de roda de leme. KOH - 400X. Banco de imagens do laboratório de Micologia Médica - LEPAC –UEM.

Preparações da parede celular de isolados de *P. brasiliensis* na forma de leveduras apresentaram 81% de carboidratos (38% hexoses, 43% amino-açúcares), 10% aminoácidos e 11% de lipídios, enquanto os mesmos, na forma miceliana apresentaram 51% de carboidratos (38% hexoses, 13% amino-açúcares), 33% aminoácidos e 8% de lipídios (KENETSUDA et al., 1972). Trata-se de uma célula eucariótica, com uma membrana celular composta de quitina, que é mais abundante quando o fungo se encontra na forma de levedura. O habitat natural de *P. brasiliensis* ainda é desconhecido existindo estudos que relatam o isolamento do fungo a partir de amostras de solo (SILVA-VERGARA, 1998), sugerindo que este é o mais provável nicho ecológico deste fungo.

Segundo San-Blas et al. (2002), a posição sistemática do *P. brasiliensis* é:

Reino	<i>Fungi</i>
Filo ou Divisão	<i>Ascomycota</i>
Subdivisão	<i>Euascomycotina</i>
Classe	<i>Plectomyceto</i>
Subclasse	<i>Euascomycetidae</i>
Ordem	<i>Onygenales</i>
Família	<i>Onygenaceae</i>
Subfamília	<i>Onygenaceae Anamórficos</i>
Gênero	<i>Paracoccidioides</i>
Espécie	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

Geograficamente, a PCM está restrita a países da América Latina como Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia (FRANCO et al., 1987), sendo a micose sistêmica mais comum no Brasil, tendo maior incidência em regiões de vegetação abundante como em florestas tropicais. A distribuição geográfica está ilustrada na figura 2. Estima-se que haja em torno de 10 milhões de pessoas infectadas, das quais 2% irão desenvolver a doença. Entretanto, em áreas com grande endemicidade, como o Brasil, a incidência anual é de 3 casos para cada 100 mil habitantes, com uma taxa de letalidade entre 2 e 23% (FELIPE et al., 2005). No Brasil, a doença é mais frequente nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Rio de Janeiro (FRANCO et al., 1989; ALMEIDA et al., 2003). Casos relatados fora das áreas endêmicas são denominados como “doença de importação”, devido ao fato dos pacientes terem residido nestas áreas em época anterior à manifestação da doença, já que a mesma pode possuir período de latência de 4 a 60 anos (em média 14 anos) (RESTREPO, 1985).



**Figura 2. Distribuição geográfica da paracoccidiodomicose.** Consenso em paracoccidiodomicose. Shikanai-Yasuda et al. 2006.

Coutinho et al. (2002), publicaram um estudo sobre 3181 óbitos por PCM no Brasil entre 1980 e 1985. A taxa média de mortalidade foi de 1,45 casos por milhão de habitantes. A doença prevaleceu como endemia nas áreas rurais e a taxa de mortalidade predominou em indivíduos do sexo masculino, atingindo 84,75% dos óbitos. Blotta et al. (1999), estudaram 584 pacientes com idade entre 5 e 87 anos no estado de São Paulo, e observou que os maiores índices da PCM ocorreram em homens com idade entre 41 e 50 anos, sendo que 46% destes trabalhavam em zona rural. Como a PCM não é de notificação compulsória, é difícil determinar com precisão o número de pessoas afetadas por essa doença. Prado et al. (2009),

mapearam a distribuição espacial de mortes, sexo, idade e outros fatores associados com a mortalidade por micoses sistêmicas no Brasil entre os anos de 1996 e 2006. Nesse período as mortes por micoses sistêmicas atingiram 3.583 pessoas, sendo aproximadamente 51,2% causadas pela PCM, doença que foi a mais importante causa de morte entre as micoses sistêmicas. Nos primeiros anos do estudo o número anual de mortes foi de 171 indivíduos, já no último ano do estudo esse número diminuiu para 148 mortes/ano. Assim como o encontrado por Blotta et al. (1999), o maior número de casos foi na região sudeste, principalmente no estado de São Paulo, seguido pela região sul, principalmente no Paraná. O maior número de mortes ocorreu em pacientes com 30 anos de idade ou mais e do sexo masculino.

A incidência da doença antes dos 12 anos de idade (pré-puberdade) é similar entre os sexos. Após essa idade, a incidência aumenta muito nos homens: 80 a 90% dos indivíduos infectados são homens entre 30 e 60 anos, predominantemente trabalhadores rurais, em áreas geográficas onde o fungo está presente na proporção de 13 homens para uma mulher em áreas endêmicas (LACAZ, 1994), e em estudos mais recentes uma taxa de 15:1 (RAMOS e SILVA, 2004). Estudos sugerem que nas mulheres os hormônios femininos conferem uma proteção natural contra esta patologia. O tratamento de *P. brasiliensis* com altas concentrações de estrogênio bloqueia a transição da forma miceliana (forma infectante do fungo) para a leveduriforme (forma parasitária) (LOOSE et al., 1983; RESTREPO et al., 1984; SALAZAR et al., 1988 e CLEMONS et al., 1989).

Pinzan et al. (2010) estudaram um modelo animal de castração para determinar a importância de hormônios masculinos e femininos no desenvolvimento e progressão da paracoccidiodomicose. Após 30 dias de infecção intraperitoneal, as células de baço dos machos castrados, que foram tratados com estradiol, responderam ao estímulo com paracoccina com maior produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e menor de interleucina-10 (IL-10), produzindo um padrão de citocinas semelhante às fêmeas intactas, nas mesmas condições experimentais. Ainda nas mesmas condições, fêmeas castradas e tratadas com testosterona tiveram aumento na produção de IL-10 e diminuição de IFN- $\gamma$ , sendo este um padrão de citocinas liberadas por células de machos intactos. Além disso, em inquéritos epidemiológicos, o teste intradérmico para PCM é positivo para ambos os sexos, mostrando que não há diferença na taxa de exposição ao fungo (DE ALMEIDA, 2005). Esses dados confirmam o papel importante dos hormônios em determinar a susceptibilidade e resistência ao *P. brasiliensis*.

No homem, várias portas de entrada têm sido sugeridas para o *P. brasiliensis*, incluindo pele, mucosas, trato gastrointestinal e pulmões. No entanto, dados experimentais e clínicos suportam a via inalatória como a principal via de entrada deste fungo (McEWEN, 1987), entretanto, casos de inoculação direta do fungo na pele ou mucosas têm sido reportados. Acredita-se que o fungo penetre pelas vias aéreas superiores, pela inalação de conídios, provocando um complexo primário pulmonar. Estas lesões podem regredir, com destruição do fungo, ou progredir, disseminando pela via linfática ou hematogênica para outros órgãos (RESTREPO; MONCADA, 1972).

Uma vez que o sistema imune entra em contato com o fungo, vários fatores podem ser coadjuvantes no mecanismo de manifestação da PCM sendo, dentre eles: carência alimentar proteica, susceptibilidade genética ao fungo, fadiga, alcoolismo, tabagismo, doenças de base concomitantes, clima, etc. (RESTREPO; MONCADA, 1972). A progressão da infecção para doença depende do tamanho do inóculo, características de patogenicidade e virulência do fungo, bem como da qualidade e integridade do sistema imunológico do hospedeiro e, possivelmente, fatores genéticos (BRUMMER et al., 1993).

A PCM manifesta-se, como outras micoses profundas, sob a forma de infecção ou doença. A PCM-infecção caracteriza-se pela ausência de sintomas clínicos, embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica, evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina (LACAZ et al., 1959). As manifestações clínicas que caracterizam a PCM-doença apresentam sinais e sintomas agrupados em dois padrões principais: forma aguda ou subaguda e forma crônica (FRANCO et al., 1987). A forma aguda ou subaguda (tipo juvenil) é habitualmente grave, de evolução rápida e afeta predominantemente jovens de ambos os sexos e compromete preferencialmente o sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodos, medula óssea) (GIRALDO et al., 1976). A resposta imune celular está usualmente deprimida, embora ocorra aumento da produção de anticorpos específicos (FRANCO, 1986). Hepatoesplenomegalia, alargamento do mediastino, massas intra-abdominais, ascites, lesões osteoarticulares e icterícia podem ocorrer (MARQUES, 2003). A mucosa raramente está envolvida e as lesões pulmonares ocorrem em menos de 5% dos casos, já o comprometimento cutâneo é comum, ocorrendo em 54% dos indivíduos. (MARQUES, 1998). A manifestação clínica mais comum envolve adenomegalia cervical ou submandibular, acompanhada de febre, perda de peso e adinamia. A letalidade nesse grupo é em torno de 11%, refletindo a severidade dessa forma da doença (MARQUES, 1998) (Figuras 3 e 4).



**Figura 3. Crianças apresentando a forma aguda da paracoccidioidomycose.** A- Notar abscessos em regiões frontal e clavicular, resultantes do acometimento osteo-articular. B – Criança do sexo feminino apresentando importante acometimento linfático abscedado. C - Linfadenomegalia inguinal. D- Acometimento linfático-abdominal com ascite e hepato-esplenomegalia. Consenso em paracoccidioidomycose. Shikanai-Yasuda et al. 2006.



**Figura 4. Jovens com a forma aguda/subaguda (tipo juvenil) da paracoccidioidomycose.** A - Massas ganglionares em região supraclavicular, cervical e submandibular. B - A linfadenomegalia da paracoccidioidomycose deve ser diferenciada de doenças hematológicas, como linfoma. C – Lesões ulceradas em face e pavilhão auricular, de aspecto verruciforme resultante de disseminação hematogênica. D - Lesões de aspecto pápulo-nodular e ulceradas, todas resultantes de disseminação hematogênica. Consenso em paracoccidioidomycose. Shikanai-Yasuda et al. 2006.

A forma crônica é a mais frequentemente encontrada (cerca de 90% dos casos), tem duração prolongada e instalação lenta e gradual. As lesões permanecem localizadas (forma unifocal) ou envolvem mais de um órgão ou sistema (forma multifocal). Na forma unifocal, um único órgão ou sistema é afetado, a resposta imune humoral é moderada e a resposta

celular é preservada (FRANCO, 1986). Na forma multifocal, vários órgãos ou sistemas estão comprometidos, com variável depressão da imunidade celular e humoral (RIVITTI; AOKI, 1999). Embora a inoculação direta do fungo na cavidade oral possa ocorrer, a contaminação da mucosa oral é mais frequente devido a eliminação de secreções pulmonares, acometendo principalmente o lábio inferior, a mucosa bucal, palato, língua e a região sub-lingual. As lesões mais características foram chamadas de estomatites muriformes e compreendem úlceras eritematosas com bases granulomatosas e pontos hemorrágicos. As lesões podem se estender pela faringe, laringe e tonsilas. O envolvimento da laringe pode produzir disfagia e destruição das cordas vocais. Lesões na traqueia podem levar a obstrução do trato respiratório. As lesões cutâneas presentes, geralmente na forma de úlceras e sem infecção secundárias, estão localizadas na face, membros superiores e inferiores e tronco, e geralmente reproduzem a granulação e os pontos hemorrágicos das lesões de mucosa (Figura 5). As lesões nos linfonodos tendem a supurar, formando fístulas na pele que drenam material purulento rico em leveduras.

A disseminação hematogênica usualmente decorre das lesões pulmonares, e nessa forma disseminada é comum o comprometimento de linfonodos, que aumentam de tamanho, e visceral, com envolvimento dos pulmões, fígado, baço, trato gastrointestinal e gênito-urinário, e ossos (RIVITTI; AOKI, 1999). A doença de Addison, com astenia, hipotensão e hiperpigmentação, pode estar presente em 3% dos casos, evidenciando o acometimento adrenal, que é documentado em 40 a 50% dos indivíduos submetidos à necropsia (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). O envolvimento intestinal resulta em dores abdominais, náusea, constipação ou diarreia, acompanhada de febre e anorexia. Em casos mais graves, pode haver oclusão parcial ou total acarretada pelo grande aumento dos linfonodos, levando a enterocolites ou retocolites devido a múltiplas ulcerações na mucosa intestinal e icterícia causadas pela obstrução do trato biliar, e apendicite secundária aguda também já foi reportada (RIVITTI; AOKI, 1999). O envolvimento do Sistema Nervoso Central (Neuroparacoccidioidomicose) pode ocorrer como meningites, meningoencefalites e sintomas de pseudotumor cerebral e acometem 9,65 a 25,45% dos pacientes que possuem a forma disseminada. As alterações clínicas nesses casos não são específicas e vão depender da localização das lesões, sendo as mais frequentes convulsões, hemiparesia, manifestações cerebelares, enxaqueca e hidrocefalia. Muitos desses casos são diagnosticados inicialmente como tumores, e ocorrem na razão de 23 homens para cada mulher acometida.



**Figura 5. Aspectos clínicos da forma crônica da paracoccidioidomicose.** A - Lesões cutâneas em face resultantes de disseminação hematogênica. Lesões papulosas e úlcero-crostosas. B - Acometimento peri-oral e ementoniano. C - Linfonodos cervicais e submandibulares fistulizados. D - Lesão vegetante com bordos irregulares em região peri-anal. Consenso em paracoccidioidomicose. Shikanai-Yasuda et al. 2006.

Embora mais rara, a pele pode também ser um local de inoculação, decorrente de traumas com vegetais ou materiais do solo. As lesões se apresentam como pápulas, tubérculos, e úlceras, com característicos pontos hemorrágicos (RAMOS e SILVA, 2004). A penetração do fungo também pode ocorrer pela ingestão, ocasionando lesões na mucosa orofaríngea e intestinal (RIVITTI; AOKI, 1999).

As sequelas na PCM são decorrentes do processo inflamatório crônico, que nos estágios mais avançados da resposta inflamatória leva a um aumento de citocinas, com acúmulo de colágeno e formação de fibrose, que leva a alterações anatômicas e funcionais dos órgãos afetados. A fibrose pulmonar é relatada em 50% dos indivíduos que apresentam a doença crônica, seguida de doença pulmonar obstrutiva crônica e suas complicações. Além das sequelas pulmonares, a fibrose também é observada em pele e mucosas, levando a alterações na voz (disfonia), obstrução da laringe, redução da comissura oral, e sinéquia das nádegas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

O diagnóstico da PCM é realizado através de métodos diretos e indiretos (diagnóstico sorológico). Os métodos diretos incluem exames microscópicos de espécimes biológicos do paciente (pus, escarro, biópsia), cultivo em meio de cultura próprio para isolamento do agente e inoculação em animais de experimentação. Múltiplas gemulações com aspecto de “roda de leme” é patognomônico de *P. brasiliensis*. Quando são atingidos órgãos internos, os testes sorológicos têm especial valor e além de auxiliar no diagnóstico, tem aplicações durante e após o tratamento. Os métodos de imunodifusão, Elisa (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

e *imunoblotting* estão disponíveis em muitos serviços de referência sendo o mais utilizado a imunodifusão em gel de agar.

O *P. brasiliensis* sintetiza numerosas substâncias (polissacarídeos, proteínas, polipeptídeos, lipídeos e glicoproteínas) que reúnem condições físico-químicas e biológicas para atuarem como antígenos. Kenetsuda et al. (1972), indicaram que a parede celular de *P. brasiliensis* é constituída por polissacarídeos, particularmente  $\alpha$  e  $\beta$ -1,3 glucana. A  $\alpha$ -1,3-glucana é exclusiva na fase de levedura e a  $\beta$ -1,3-glucana está presente na fase de bolor. Somada a estas diferenças bioquímicas encontra-se também a galactomanana, um componente imunogênico presente em maior proporção na fase de bolor, enquanto na fase de levedura são mais encontrados glucosaminas e glicoproteínas. Em 1977, YARZABAL et al. verificaram que os antígenos liberados no sobrenadante de culturas de *P. brasiliensis* formavam uma banda específica para soros de pacientes com PCM em teste de imunoeletroforese. Esta banda, denominada banda E, mostrou-se de importância diagnóstica pela especificidade e frequência com que ocorre em soros de pacientes com PCM. Verificou-se, posteriormente, que a banda E era composta por 2 componentes, E1 e E2. O antígeno E1, com atividade de fosfatase alcalina era revelado de forma variável, enquanto que o antígeno E2 podia ser visto na imunoeletroforese como sendo específico da PCM. A utilização do antígeno E2, em imunodifusão, permitiu identificar reações específicas com soros de pacientes com PCM. Em 1986, Puccia et al. investigaram a natureza do antígeno E2 e utilizando filtrados de cultura e cromatografia em coluna de gel filtração, obtiveram três frações (F1, F2 e F3), sendo que apenas a fração F1 mostrou-se imunorreativa em imunodifusão. Esta fração apresentou afinidade para a concanavalina A e, quando eluída desta lectina, imobilizada em coluna de Sepharose e analisada em SDS-PAGE, revelou componentes de 43, 55 e 70 kDa, e um componente de alto peso molecular com migração difusa.

Estudos de imunoprecipitação com soros de pacientes com PCM (PUCCIA et al., 1991) demonstraram que apenas a glicoproteína com 43 kDa (gp43) era imunorreativa em 100% dos soros de PCM e não reagia com soros normais. Posteriormente, verificou-se que a gp43 era o principal componente antigênico presente nas frações anteriormente descritas por Restrepo e Moncada (1974) e Yarzabal et al. (1977). Desde então, este componente antigênico do fungo, considerado um marcador sorológico da PCM, vem sendo utilizado no sentido de aumentar a especificidade e sensibilidade dos testes sorológicos (CAMARGO et al., 1994). Títulos de anticorpos anti-gp43 são utilizados como parâmetro para avaliar a terapêutica e determinar o prognóstico da doença, e o aumento dos níveis de anticorpos está correlacionado à gravidade da doença (BIAGIONI et al., 1984). Vicentini et al. (1994),

estudando a relação de componentes da matriz extracelular com *P. brasiliensis*, demonstraram que a laminina liga-se de forma específica a células leveduriformes do fungo, aumentando *in vitro* a adesão fúngica à monocamada de células epiteliais de rim de cão (MDCK) de forma dose-dependente. Foi demonstrado também, que a gp43, presente na superfície do fungo, era o principal ligante de laminina de forma específica e saturável.

A gp43 reside parcialmente na parede celular (STRAUS et al., 1996) e é apontada como um fator de virulência do fungo por possuir propriedades adesivas a matriz extracelular (VICENTINI et al., 1994), além de atividades proteolíticas (capaz de hidrolisar caseína, colágeno e elastina). Estudos realizados por André et al., (2004) mostraram que em camundongos infectados com leveduras de *P. brasiliensis* tratadas com laminina, houve diminuição da carga fúngica do pulmão, bem como a diminuição da resposta inflamatória no tecido pulmonar. Mendes-Gianini et al. (2006) mostraram que além do *P. brasiliensis* ter capacidade de aderir e invadir células epiteliais, os componentes da matriz extracelular (laminina e fibronectina), devem mediar à adesão de gp43 em VERO (*Kidney epithelial cells from African Green Monkey*). Também foi demonstrado que a gp43 inibe a fagocitose do fungo através de não-ativação dos macrófagos peritoneais de camundongos *in vitro*, sugerindo que essa molécula também estaria envolvida na inibição da ativação e na habilidade dessas células em matar o fungo. Baseando-se nessas informações acredita-se que a gp43 medeia um mecanismo de escape do fungo, o que facilita o estabelecimento e o destino de infecção primária em hospedeiro suscetível (FLÁVIA POPI et al., 2002). Mais recentemente, também foi caracterizada a proteína de 30 kDa, que também participa da adesão do fungo se ligando a laminina. Essa proteína é encontrada em maior quantidade em isolados de *P. brasiliensis* que possuem maior capacidade de adesão, e foi verificado em ensaios com monocamada de células epiteliais, que o pré-tratamento com essas duas proteínas, inibiram intensamente a adesão do fungo às células (ANDREOTTI et al., 2005).

O tratamento da PCM inclui o uso de drogas antifúngicas, suporte nutricional, tratamento de eventuais sequelas e comorbidades e a prevenção de doenças oportunistas. Para o tratamento da PCM é necessária quimioterapia antifúngica que embora prolongada, não assegura destruição completa do fungo. O período de tratamento depende da droga usada e severidade da doença. Além da terapêutica antifúngica específica, o paciente com PCM necessita de medidas gerais que melhorem o estado de desnutrição proteico-calórica e a imunodepressão celular geralmente associada à infecção pelo *P. brasiliensis*. Estes achados são frequentemente agravados pela concomitância do tabagismo, etilismo, insuficiência adrenal e outras infecções associadas, características essas comumente observadas entre os

pacientes. Deste modo, o repouso, a dieta hiperproteica e hipercalórica, associada à suplementação vitamínica são fatores importantes para a obtenção dos critérios de cura, assim como a restrição do álcool, do tabaco e a terapêutica da doença de Addison e de infecções associadas como enteroparasitoses e co-infecções bacterianas respiratórias (Boletim Epidemiológico Secretaria de Estado da Saúde 2001).

Muitas classes de drogas antimicóticas têm sido usadas no tratamento da PCM, incluindo sulfonamidas (sulfadoxina, sulfametoxipiridazina, cotrimazina e sulfametoxazol-trimetoprim), anfotericina B, azóis (cetoconazol, itraconazol e fluconazol) e terbinafina. As sulfonamidas são a primeira classe de drogas disponíveis para o tratamento de pacientes com PCM. Apesar do fato de derivados de sulfonamidas terem sido usados com sucesso nessa doença, a grande experiência documentada na literatura médica refere-se a sulfadiazina e à combinação de trimetoprim e sulfametoxazol. Embora a resposta clínica geral inicial para o tratamento seja satisfatória, longos períodos podem ser necessários (geralmente mais de 2 anos), o que leva a uma preocupação crescente quanto a toxicidade das drogas, os custos de tratamento e altas taxas de abandono do tratamento. A maioria dos centros médicos sugerem que a combinação trimetoprim e sulfametoxazol deve ser utilizada como primeira escolha terapêutica devido à sua eficácia clínica, baixo custo, segurança e boa penetração no sistema nervoso central. O tratamento antifúngico geralmente dura anos, até que haja uma resposta clínica e resolução completa ou calcificação das lesões parenquimatosas documentadas por imagens radiológicas (ELLIAS et al., 2005; ALMEIDA et al., 2004).

A introdução de azóis para a prática clínica representou um avanço importante em micologia médica. Miconazol, os primeiros derivados azólicos disponíveis para administração parenteral eram usados para tratar pacientes com PCM e apresentaram bons resultados clínicos. No entanto, este fármaco foi posteriormente excluído devido ao seu espectro antifúngico limitado, perfil inseguro e falta de formulação oral (ALMEIDA et al., 2004, MAERTENS, 2004). Cetoconazol mostrou ser uma alternativa no tratamento de pacientes com PCM, mas podem ocorrer recidivas. Tratamentos por períodos de 6-18 meses têm sido utilizados por diferentes autores, mas é necessária cautela devido a eventos adversos, incluindo a toxicidade hepática e bloqueio da síntese de testosterona e de cortisol (MAERTENS, 2004; DEL NEGRO et al., 1982).

A anfotericina B foi utilizada pela primeira vez no tratamento da PCM em 1958, com grande sensibilidade do fungo. Ao lado de sua comprovada eficácia, é uma droga tóxica que requer longo período de hospitalização para sua administração (CAMPOS et al., 1984). Essa droga é muito eficaz contra o *P. brasiliensis*, mas a longo prazo ainda é necessária terapia

supressiva com derivados de sulfa para evitar recaídas. Levando em consideração toda a toxicidade relacionada ao tratamento com anfotericina B, a sua indicação terapêutica foi limitada a pacientes com deteriorações clínicas graves ou refratários ao tratamento com sulfa e derivados de azóis (DILLON et al., 1986; NEGRONI et al., 1977).

A palavra "cura" tem difícil aplicação nos pacientes portadores de PCM pela dificuldade de erradicação do *P. brasiliensis*. As diferentes modalidades terapêuticas diminuem a quantidade de fungos no organismo, permitindo a recuperação da imunidade celular e restabelecendo o equilíbrio entre parasita e hospedeiro. Por esse motivo, após a interrupção do tratamento, uma vez obtidos os critérios de cura, os pacientes devem ser acompanhados ambulatorialmente com exame clínico e sorológico. A positivação ou mudança nos padrões desses exames podem preceder à recaída clínica, portanto frente a esta situação justifica-se a reintrodução da terapêutica antifúngica.

Vários mecanismos da imunidade inata, como ativação das proteínas do Sistema Complemento e atividade microbicida das células *natural killer* (NK) e de fagócitos, constituem forma significativa no combate aos fungos patogênicos. O papel das células NK foi estudado no sangue periférico de pacientes com a PCM e em hamster, como modelo experimental. Estas células apresentam atividade citotóxica diminuída na PCM doença, sugerindo distúrbio imunológico associado à depressão da imunidade celular tanto em pacientes quanto no modelo experimental (PERACOLI et al., 1995). Polimorfonucleares (PMNs) estão presentes em grande quantidade nos tecidos parasitados e apresentam importante papel na atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*. Eles utilizam mecanismos dependentes dos metabólitos de oxigênio como Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ânio superóxido, quando estas células são estimuladas com IFN- $\gamma$ , fator de necrose tumoral- alfa (TNF- $\alpha$ ), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos GM-CSF e IL-15 (RODRIGUES et al., 2007; TAVIAN et al., 2008). Estas células têm papel essencial nos estágios iniciais da infecção, conferindo resistência ao hospedeiro e contribuindo para o desenvolvimento da resposta imune efetiva contra o fungo. As mesmas ainda produzem grandes quantidades de prostaglandinas E2 e leucotrienos, perpetuando o edema e o processo inflamatório, porém, minimizando a capacidade de dano celular causado pelos monócitos. No entanto, quando desafiados com o fungo *in vitro*, os PMNs produzem altos níveis de IL-8, desencadeando processo anti-apoptótico de neutrófilos, favorecendo a multiplicação e sobrevivência do fungo no interior da célula fagocitária (ACORCI et al., 2009).

A interação inicial entre as células do sistema imune e os microrganismos é mediada por muitos tipos de receptores, que reconhecem padrões moleculares de patógenos,

denominados de receptores de reconhecimento de padrões (PRR). Os receptores do tipo Toll (TLRs) constituem uma família de moléculas que reconhecem uma ampla variedade microbiana e seus produtos, os chamados padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Os TLRs são expressos em diversas células do sistema imune inato, como os PMNs, macrófagos, células dendríticas e linfócitos. Sua ativação desencadeia uma cascata de sinalização que resulta numa resposta inflamatória através da produção de citocinas, e aumento na regulação de moléculas co-estimuladoras levando a iniciação da resposta imune adaptativa antígeno específica. Por outro lado, já foi mostrado em modelos experimentais que leveduras do fungo conseguem penetrar em macrófagos do hospedeiro por um processo mediado por TLR, especificamente os TLR2 e TLR4. A interação entre os receptores e o fungo é considerada por Calich et al. (2008) um mecanismo de escape desenvolvido pelo mesmo. Entretanto, outro trabalho desenvolvido pelo mesmo grupo, usando camundongos C57BL/6 e deficientes para TLR2, mostrou que tanto *in vitro* como *in vivo*, a presença do TLR2 leva ao desenvolvimento de uma doença mais grave, sendo usado pelo fungo para aumentar a secreção de óxido nítrico (NO) e citocinas pelos macrófagos. Este mesmo trabalho porém, não verificou nenhuma diferença na sobrevivência dos animais, e ambos os grupos mostraram o mesmo padrão de lesão pulmonar. Foi verificado que o controle do fungo nos animais deficientes estava relacionado a ativação de uma resposta do tipo Th17 e uma inflamação pulmonar exacerbada, contendo altos números de PMNs e diminuída presença de células T regulatórias (Tregs). Dessa forma, a expressão de TLR2 tem um efeito benéfico na infecção fúngica pulmonar devido ao seu controle negativo na imunidade por Th17 e danos ao tecido (LOURES et al., 2009).

O desenvolvimento predominante de uma subpopulação de células T durante uma infecção é extremamente importante, pois certos patógenos são mais efetivamente controlados por uma resposta do tipo celular (Th1) e outros, por uma resposta do tipo humoral (Th2) (SHER; COFFMAN, 1992). Em algumas doenças crônicas, a resposta celular de células T CD4<sup>+</sup> inapropriada pode exacerbar a doença, levando a uma inabilidade do hospedeiro para erradicar o microrganismo. Calich et al. (1985), infectando diferentes linhagens de camundongos isogênicos via intraperitoneal com células leveduriformes de *P. brasiliensis*, definiram um modelo experimental no qual obtiveram camundongos altamente resistentes (A/Sn), intermediários (BALB/c, C57BL/10 e C3He/Fe) e suscetíveis à doença (B10.A, B10.D2/oSn e B10.D2/nSn). A resposta imune a antígenos do fungo foi estudada neste modelo experimental e os resultados mostraram que os animais resistentes apresentavam imunidade celular aparentemente normal, ou seja, com presença de macrófagos ativados

durante todo o processo infeccioso e com poucas lesões teciduais. Por outro lado, os animais suscetíveis mostraram depressão da resposta celular, altos níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis* e comprometimento de vários órgãos (CALICH et al., 1988). Nesse modelo experimental de PCM, a resistência à infecção em camundongos A/Sn foi relacionada com a produção de níveis elevados de IFN- $\gamma$  no decorrer da infecção, padrão este compatível com uma resposta do tipo Th1. A suscetibilidade de camundongos B10.A está relacionada com baixa produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  no início da infecção, seguida de produção elevada de IL-5, IL-10 e TNF- $\alpha$ , padrão característico de uma resposta do tipo Th2 (CALICH; KASHINO, 1998).

A ativação de uma resposta imunológica é consequência de uma série de interações envolvendo diferentes tipos celulares. Para que ocorra uma resposta mediada por linfócitos T, é necessário que estes interajam com células apresentadoras de antígeno (APCs), proliferem e se diferenciem em células efetoras. As células dendríticas (DCs), macrófagos e linfócitos B são células apresentadoras de antígenos “profissionais” capazes de fazer o processamento do antígeno e a apresentação de peptídeos a linfócitos T (UNANUE; ALLEN, 1987). DCs de camundongos resistentes a PCM, quando comparados com camundongos susceptíveis, são mais eficientes em induzir uma resposta do tipo Th1 tanto *in vitro* como *in vivo* (ALMEIDA; LOPES 2001, FERREIRA et al., 2003) e as DCs pulmonares de camundongos B10A, infectados intratraquealmente com *P. brasiliensis*, são células produtoras de grandes quantidades de IL-10, ao contrário de camundongos A/J, e a produção dessa citocina foi mediada pela ligação com os receptores do tipo dectina-1 e TLR-2 (FERREIRA et al., 2007). Dessa forma, podemos dizer que a interação entre o *P. brasiliensis* e as DCs pode ser considerada um fator crucial na patogênese da PCM.

### **As células dendríticas e os receptores DEC-205.**

As DCs foram descritas por Steinman e Cohn (1973) e desde então, tem interessado os pesquisadores de todo o mundo por serem capazes de determinar a especificidade e natureza da resposta imune (Th1/Th2). As DCs são células apresentadoras de antígenos capazes de fazer a ligação entre a resposta imune inata e adaptativa, sendo as únicas, entre as APCs, a migrarem para os órgãos linfóides secundários para apresentarem o antígeno aos linfócitos T *naive* (WICK, 2003). As DCs estão localizadas nos sítios de exposição de antígenos, como a mucosa e tecidos periféricos. Os precursores destas células originam-se na medula óssea e constantemente migram para diversos tecidos, tais como pele (onde são denominadas de

células de Langerhans), sistema gastrointestinal, respiratório, sangue e linfa (revisado por JACOBS et al., 2008).

As DCs podem ser subdivididas em diferentes subpopulações, que possuem como característica fenotípica comum a expressão da molécula CD11c. As principais diferenças fenotípicas entre as subpopulações de DCs são a expressão diferencial dos marcadores CD11b, CD8 e B220. As DCs que expressam B220 apresentam quantidades intermediárias da molécula CD11c em sua superfície, e são denominadas “células dendríticas plasmocitóides” (pDCs). As DCs caracterizadas pela alta expressão de CD11c são denominadas “células dendríticas convencionais” (cDCs) e subdivididas em células CD8 positivas e CD8 negativas, sendo que as últimas expressam a molécula CD11b. Há ainda populações de DCs caracterizadas pela expressão de CD4 concomitante ou não, com a expressão de CD8. No entanto, essa subpopulação é menos estudada. As diferentes subpopulações de DCs apresentam, além das diferenças fenotípicas, algumas diferenças funcionais e em seu desenvolvimento (SHORTMAN; LIU, 2002; SHORTMAN; NAIK, 2007).

Além de poderem ser distinguidas quanto às subpopulações, as DCs podem ser diferenciadas quanto ao seu estado de ativação. Na ausência de sinais inflamatórios ou infecção, as DCs possuem um fenótipo caracterizado pela baixa expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II) e das moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86, CD40 e possuem uma alta capacidade de capturar antígenos. Quando neste estado de ativação, as DCs são pobres estimuladoras de respostas de células T e são denominadas DCs imaturas. Quando sinais inflamatórios estão presentes ou as DCs são expostas a componentes derivados de patógenos, como lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou RNA dupla fita, seu fenótipo sofre uma alteração significativa, um processo denominado maturação, compreendendo mudanças funcionais e fenotípicas, com um aumento na expressão de MHC II e moléculas co-estimuladoras (GUERMONPREZ et al., 2002). As DCs são então ditas DCs maduras e tornam-se capazes de estimular respostas de células T (GUERMONPREZ et al., 2002). Durante o processo de maturação a expressão do receptor de quimiocina CCR6 diminui, ao passo que a expressão do receptor CCR7 aumenta. A expressão de CCR7 se dá em outras células além das DCs, como linfócitos T e B, as quimiocinas CCL19 e CCL21 são seus únicos ligantes e estão presentes constitutivamente em células epiteliais dos órgãos linfóides secundários. Essa ligação guia a migração das DCs maduras para linfonodos e sua fixação nas áreas de células T (revisado por FOSTER et al., 2008). Dessa forma, o processo de maturação das DCs integra-se ao processo de migração das

mesmas em direção às áreas T dos linfonodos, fazendo com que a probabilidade do encontro com um linfócito T antígeno-específico aumente.

Os receptores de superfície relatados como responsáveis pela ativação e maturação das DCs são: TLRs, receptores de citocinas, receptores de TNF (TNF-R) e receptores para a porção Fc (FANGER et al., 1996; ESPOSITO-FARESE et al., 1995 e GEISSMANN et al., 2001). A identificação dos TLRs trouxe uma grande contribuição no estudo do reconhecimento inato de microrganismos, entretanto, recentes evidências indicam que receptores do tipo “não-toll” também exercem um importante papel nesses processos, particularmente na imunidade antifúngica. Um exemplo são os membros da família dos receptores de lectina do tipo C, como o Receptor de Manose (MR), DEC205, ICAM-3, DC-SIGN, dectina-1, dectina-2 e as colectinas (WILLMENT; BROWN, 2007). O receptor DEC205 pertence à família das lectinas tipo C do tipo I que inclui o receptor conhecido como MMR (*macrophage mannose receptor*) (JIANG et al., 1995; MAHNKE et al., 2000). Como o MMR, o receptor DEC205 apresenta um domínio amino-terminal rico em cisteínas, um domínio de fibronectina tipo II e múltiplos domínios de reconhecimento de carboidratos (revisto por FIGDOR et al., 2002). Porém, a distribuição tecidual do DEC205 difere da distribuição do MMR, o primeiro é altamente expresso pelas DCs presentes nas zonas de células T dos tecidos linfóides, particularmente nas DCs CD8<sup>+</sup> (DEN HAAN et al., 2000). Já o receptor MMR é expresso por macrófagos teciduais (GUO et al., 2000; LINEHAN et al., 1999).

Em vários modelos de doenças infecciosas, DCs estão sendo estudadas por sua capacidade de servir como adjuvante e vacina mediando proteção contra bactérias, vírus, parasitas ou patógenos fúngicos (MOLL; BERBERICH, 2001). Ahuja et al. (1999), mostraram que DCs pulsadas com proteínas de *Leishmania donovani* e transferidas adotivamente para camundongos BALB/c induziram uma resposta antígeno específica do tipo Th1. A transferência adotiva de DCs pulsadas com *Candida* e produtoras de IL-10 induziram a ativação de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> em linfonodos mesentéricos, com diminuição da resposta inflamatória nos sítios de infecção e contribuiu para a ocorrência de uma memória imune protetora contra o fungo. DCs transfectadas com RNA de *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* também induziram proteção em modelo murino (BACCI et al., 2002; BOZZA et al., 2003). DCs estão envolvidas diretamente na relação entre patógeno e o sistema imune do hospedeiro, levando na maioria das vezes a uma eficiente resposta imune no hospedeiro, com ativação de linfócitos T *naive*. No entanto, alguns patógenos têm a capacidade de afetar as funções biológicas destas células através da inibição de suas moléculas de superfície, bem

como da inibição da síntese de citocinas importantes na ativação de linfócitos do tipo Th1, como a IL-12. Van Tvelt et al. (2002) verificaram que *Trypanosoma cruzi* é capaz de inibir moléculas de MHC e co-estimuladoras, em modelo murino, impedindo ativação eficiente das DCs.

Na última década, alguns pesquisadores, se empenharam em estudar o direcionamento de antígenos a DCs, utilizando anticorpos monoclonais contra o receptor de DCs DEC-205 ( $\alpha$ DEC-205) fusionados a antígenos de interesse. Em 2001, Hawiger et al. mostraram a importância da administração do anticorpo juntamente com um estímulo de maturação para DCs. O mesmo foi mostrado por Bonifaz et al. (2002) usando  $\alpha$ DEC-OVA. Eles verificaram, entretanto, que quando o anticorpo quimérico foi injetado na ausência de um estímulo de maturação, o mesmo induzia tolerância periférica. Por outro lado, a administração combinada do anticorpo quimérico fusionado ao antígeno com um estímulo para a maturação para DCs (como o anticorpo agonista anti-CD40) levou a ativação prolongada de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Além disso, a imunidade induzida pelo direcionamento do antígeno às DCs foi de longa duração e mais efetiva do que a administração de potentes adjuvantes como adjuvante completo de Freund (CFA).

Boscardin et al. (2006) fusionaram a proteína circumsporozoitária (CSP) de *Plasmodium yoelii*, um agente causador de malária murina, e verificaram que uma única dose do anticorpo quimérico  $\alpha$ DEC-CSP, juntamente com um estímulo de maturação para as DCs foi capaz de induzir células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , em diferentes linhagens de camundongos e após a segunda dose, uma boa resposta imune humoral também foi verificada. A fusão do anticorpo  $\alpha$ DEC205 com LcrV de *Yersinia pestis* levou a uma forte resposta antígeno-específica por linfócitos T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1, assim como uma resposta humoral, incluindo altos títulos de anticorpos IgG2a (BALB/c) ou IgG2c (C57BL/6), compatíveis também com padrão Th1 (DO et al., 2008).

Trumpfheller et al. (2006) utilizaram o anticorpo  $\alpha$ DEC205 acoplado à proteína GAG do vírus HIV (*human immunodeficiency virus*), e demonstraram que uma única dose do anticorpo quimérico  $\alpha$ DEC-GAG foi capaz de levar a indução de uma forte resposta imune mediada principalmente por células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ . Além disso, foi observado proteção nos animais imunizados com o anticorpo  $\alpha$ DEC-GAG (na presença de estímulo de maturação) quando estes foram desafiados com um vírus vaccinia transgênico expressando a proteína GAG. Na tentativa de comparar o direcionamento a diferentes receptores, o grupo construiu anticorpos quiméricos  $\alpha$ DEC205,  $\alpha$ MMR e  $\alpha$ DC-SIGN fusionados a p24 e verificou

que o primeiro levou a maior proliferação e produção de IFN- $\gamma$  por células T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> entre as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes.

Para estender o conceito de direcionamento de antígenos para terapêutica em humanos, uma série de anticorpos monoclonais humanos (hDEC205) foram produzidos a partir de camundongos transgênicos que tiveram o locus de Ig murina substituído por Ig humana. Camundongos expressando o receptor hDEC205 também foram gerados para estudos pré-clínicos *in vivo*, e quando imunizados com o  $\alpha$ hDEC205 fusionado a subunidade p24 da proteína GAG levaram a uma resposta por anticorpos e por células T, dependente do uso de um estímulo de maturação, e primariamente por células T CD4<sup>+</sup>. Títulos ainda mais altos de anticorpos foram conseguidos após segunda imunização, utilizando somente o anticorpo monoclonal, na ausência de adjuvante (CHEONG et al., 2010).

### **Em busca de uma vacina eficiente contra *P. brasiliensis*: O peptídeo P10.**

No contexto das doenças infecciosas, os anticorpos podem potencializar a imunidade através de diversos mecanismos como: neutralização de toxinas, opsonização, ativação de complemento, liberação de citocinas, citotoxicidade celular e apresentação antigênica. A imunidade celular tanto específica como não específica proporciona a principal linha de defesa contra infecções fúngicas. Essa observação deriva principalmente da observação clínica associada com dados experimentais. Reconhecidamente, indivíduos com imunidade celular comprometida são mais susceptíveis a micose (LEVITZ et al., 1992). Dados clínicos e experimentais indicam que a imunidade mediada por células tem importante papel na defesa do hospedeiro contra infecção por *P. brasiliensis*, enquanto resposta celular deprimida e aumento da produção de anticorpos está associada as formas mais severas da doença (FRANCO et al., 1986; CASTAÑEDA et al., 1988).

Embora na PCM os anticorpos sejam associados normalmente a quadros mais severos da doença, não está claro se anticorpos contribuem essencialmente para geração ou manutenção da susceptibilidade, ou ainda se são apenas marcadores do estágio da doença. Anticorpos anti-gp70 foram capazes de promover a formação de granulomas compactos e abreviar o curso da PCM (DE MATTOS GROSSO et al., 2003), contribuindo para a idéia de que imunoglobulinas possuem uma participação positiva na proteção contra *P. brasiliensis*.

Baseado na sequência da gp43, que codifica um polipeptídeo de 416 aminoácidos, Taborda et al. (1998) selecionaram diferentes sequências e verificaram que apenas o peptídeo constituído de 15 aminoácidos (QTLIAIHTLAIRYAN) denominado P10, induziu linfoproliferação em células de camundongos previamente imunizados com gp43 ou P10.

Nesse trabalho, foi demonstrado que animais, após imunizações nas patas com gp43 ou P10 juntamente com CFA e desafiados intratraquealmente com leveduras do fungo, apresentaram contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) 200 vezes menores que os controles, evidenciando a proteção desencadeada pela administração do peptídeo. A sequência do P10 mostra-se conservada entre os isolados de *P. brasiliensis*, segundo estudo desenvolvido por Moraes et al. (2000) que verificou que nenhuma das substituições verificadas no gene da gp43 em diferentes isolados ocorreu no epítipo P10 para células T CD4<sup>+</sup>.

Devido a seu potencial de proteção em protocolos de vacinas, vários estudos se seguiram com esse objetivo. Marques et al. (2006) estudaram a associação do P10 com quimioterápicos conhecidos para o tratamento da PCM. Quando os animais tiveram o tratamento iniciado 48 horas após a infecção, a determinação de UFC nos órgãos mostrou uma redução significativa de fungos recuperados a partir de animais tratados com a combinação P10 e quimioterápico, em relação aos demais grupos. No grupo tratado com o sulfametoxazol, uma proteção inicial foi seguida de recaída, por outro lado no grupo que recebeu a associação da droga com P10 houve o controle da doença, que se reflete em áreas histológicas com poucos ou indetectáveis células de levedura. Em 2008, o mesmo grupo fez um estudo similar, analisando a associação do P10 com o itraconazol e a combinação sulfametoxazol/trimetoprim em camundongos anérgicos e observaram que os mesmos apresentaram resposta do tipo Th1 protetora, com elevados níveis de IFN- $\gamma$  e IL-12, além de reduzido número de granulomas em relação aos animais que receberam uma única terapia (MARQUES et al., 2008). Amaral et al. (2010), propôs um sistema de entrega do P10 usando nanopartículas de poli(ácido-lático-ácido glicólico) (PLGA), com o intuito de reduzir a degradação *in vivo* do peptídeo e com isso houve uma diminuição drástica na quantidade de péptido necessária para induzir um efeito protetor.

Outro estudo comparou diferentes preparados com o adjuvante ligante de TLR5, a flagelina FliC de *Salmonella entérica*, entre eles gp43+FliC, P10+FliC e P10 fusionado geneticamente a flagelina e verificou que animais imunizados com a mistura P10+FliC teve uma melhor relação de IL-12/IL-10 e IFN- $\gamma$ /IL-10, além de diminuição de UFC e na histopatologia a visualização de um tecido pulmonar com organização alveolar preservada sem indicativo de infiltração por células fagocíticas (BRAGA et al., 2009).

Mais recentemente pensou-se no desenvolvimento de uma vacina de DNA, utilizando a sequência do P10. Para isso, utilizaram um plasmídeo contendo a sequência do P10 e /ou IL-12, e verificaram que a administração intramuscular de plasmídeos contendo o inserto de P10 induziu uma redução significativa da carga fúngica no pulmão. A utilização do mesmo,

concomitante a administração de plasmídeos contendo inserto que codifica a IL-12 mostrou ser ainda mais eficaz na eliminação do fungo, restaurando a arquitetura pulmonar normal com tratamento a longo prazo (RITTNER et al., 2012). Em adição, verificou-se que a presença de células de T de memória e células T reguladoras aumentam nos baços e pulmões desses animais e que as mesmas, após imunizações repetidas, substituem as células T pró-inflamatórias, e conferem uma proteção à longo prazo, enquanto preservam a integridade do tecido infectado (AMORIM et al., 2013).

### **A escolha do estímulo de maturação no direcionamento de antígenos na PCM.**

No início dos estudos de direcionamento para células dendríticas, foi mostrado que na ausência de um estímulo para maturação dessas células, as mesmas entravam em processo de tolerância, o que não era satisfatório para desenvolvimento de uma resposta imune efetiva. Também já descrevemos acima que as DCs identificam a presença de patógenos (PAMPs) através dos PRRs, e os TLRs são, dentre esses receptores, os mais bem caracterizados. Dessa forma, os estudos de direcionamento começaram a testar o agonista de TLR3, um RNA dupla fita sintético denominado Poli I:C (*Polyinosinic:polycytidylic acid*).

Poly I:C é descrito como potente indutor de IL-12 e IFNs do tipo 1, através da ativação da imunidade inata via receptores TLR3 (endossomal) e o MDA5 (citoplasmático). Várias versões modificadas de Poly I:C foram desenvolvidos na década de 1970 para reduzir a toxicidade e alterar o perfil biológico destes indutores de IFNs. Carter et al, desenvolveram um Poly I:C modificado através da substituição de um ácido uridílico a uma razão molar de 12:1, na síntese da cadeia do ácido policitidílico resultando numa molécula de cadeia dupla com desemparelhamentos ocasionais e um metabolismo muito mais rápido *in vivo* (PolyIC12U). Já o Poly I:C condensado com poli-L-lisina e carboximetilcelulose (Poly IC:LC) é uma outra versão quimicamente estabilizada de RNA de cadeia dupla sintético. Ambos tem sido amplamente estudados e mostraram proteção em diferentes modelos de doenças (revisado por MIFSUD et al., 2014). A formulação comercial de polyIC12U (Ampligen® [rintatolimod], Hemispherx Biopharma, PA, EUA), tem avançado para fase final de desenvolvimento clínico como terapia para a síndrome da fadiga crônica (NICODEMUS; BEREK 2010).

Os resultados dos estudos de direcionamento de antígenos na presença de Poly I:C, tem-se mostrado muito promissores na indução de uma resposta imune polarizada do tipo Th1 e por esse motivo, a utilização do agonista de TLR3, é uma ferramenta eficaz para auxiliar na indução de uma resposta imune efetora na PCM experimental.

Sabendo que a PCM é uma doença frequente no Brasil e América Latina, da dificuldade no tratamento da PCM com longos períodos de internação, baixa adesão ao mesmo, e recidivas, nos propusemos uma vacina terapêutica baseada no direcionamento de antígenos de *P. brasiliensis* para DCs, na presença do Poly I:C, na tentativa de desencadear uma resposta Th1 inicial e contribuir para uma boa evolução clínica da doença.

## ***II. Objetivos***

---

**Objetivo Geral**

O objetivo principal deste projeto é produzir anticorpos quiméricos  $\alpha$ DEC-205 em fusão com a gp43 ou com o P10, e utilizá-los em ensaios de imunoterapia e vacinação na PCM.

**Objetivos específicos**

- Síntese de cDNA de gp43 à partir de RNAm de *P. brasiliensis*;
- Clonagem da sequência de DNA da gp43 em fusão com as sequências dos anticorpos  $\alpha$ DEC-205 e isotipo controle;
- Clonagem da sequência de DNA do P10 em fusão com as sequências dos anticorpos  $\alpha$ DEC-205 e isotipo controle;
- Produção dos anticorpos quiméricos por transfecção transiente de células HEK293T e purificação dos mesmos à partir dos sobrenadantes das culturas;
- Imunização de camundongos com os diferentes anticorpos quiméricos na presença de estímulo de maturação (ligante de TLR3) e análise da resposta imune celular;
- Análise da resposta imune humoral gerada após a administração de uma única dose dos anticorpos quiméricos  $\alpha$ DEC-205 ou isotipo controle seguida de uma dose de reforço consistindo do próprio anticorpo;
- Avaliação da resposta imune em animais imunizados com os anticorpos quiméricos após desafio dos mesmos com a cepa virulenta Pb18;
- Avaliação da resposta imune em animais infectados com *P. brasiliensis* e submetidos a terapia utilizando os anticorpos quiméricos.

### ***III. Material e métodos***

---

## 1. Animais

Camundongos machos da linhagem BALB/c com 8 a 12 semanas de vida foram obtidos do Biotério de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em padrão sanitário livre de patógenos específicos (SPF) e alimentados com ração comercial irradiada. Os camundongos foram sacrificados de acordo com critérios aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – CEEA-FCF/USP-Protocolo 292 (Anexo 1).

## 2. Fungo

Foi utilizada a cepa virulenta Pb18 (KASHINO et al., 1987) do *P. brasiliensis*. A mesma foi mantida em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-ágar (MERCK - Alemanha), em estufa a 37 °C, com repiques semanais.

## 3. Isolamento de ácido ribonucleico (RNA) total de *P. brasiliensis*.

Para obtenção do RNA total do fungo *P. brasiliensis*, o mesmo foi cultivado em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-ágar. As colônias foram transferidas para um gral de porcelana e o fungo foi submetido à extração do material genético com auxílio de nitrogênio líquido para quebrar sua parede. O material ficou durante todo o tempo congelado, através da adição contínua de nitrogênio. O mesmo foi macerado, e quando obtivemos aspecto de pó homogêneo, foi adicionado Trizol (1 mL para cada  $1 \times 10^7$  células fúngicas), e essa suspensão foi agitada por 10 minutos (min). Para retirar o material fúngico da solução, os tubos foram centrifugados à 10000 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e incubado à temperatura ambiente por 5 min, para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. A este tubo, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, para cada 1 mL de trizol, homogeneizando vigorosamente com as mãos por 15 segundos (s), e incubado a 15-30 °C por 2 a 3 min. Após incubação, a mistura foi centrifugada por 15 min a 12000 g e 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo. Para remoção da contaminação por peptideoglicanos, a fase aquosa, que contém o RNA, foi separada e precipitada com 0,25 mL de isopropanol ( $C_3H_8O$ ) adicionados de 0,25 mL de uma solução 0,8 M de citrato de sódio ( $Na_3C_6H_5O_7$ ) e 1,2 M de cloreto de sódio (NaCl) para cada 1 mL de trizol, e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente seguida de centrifugação a 12000 g durante 10 min a 4 °C. O RNA precipitado, invisível antes da centrifugação, formou um precipitado visível no fundo do tubo. O mesmo foi lavado com 1 mL de etanol ( $C_2H_6O$ ) 70% e centrifugado 7500 g a 4 °C

durante 5 min. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e ficou aberto para evaporação do etanol 70%. Finalmente, o RNA seco foi suspenso em 50  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop.

#### **4. Tratamento da amostra de RNA com DNase.**

A amostra obtida foi tratada com DNase, para retirar qualquer vestígio de DNA genômico. Para 1  $\mu\text{g}$  de RNA foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de tampão de reação com cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), 1  $\mu\text{L}$  de DNase I/ livre de RNase, o volume correspondente da amostra de RNA e quantidade suficiente de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A mistura foi incubada a 37 °C por 30 min. Após esse intervalo, foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 25 mM e incubado por 10 min a 65 °C.

#### **5. Avaliação da qualidade do RNA por meio de eletroforese em gel de agarose.**

A eletroforese em gel de agarose foi realizada para avaliar a integridade do RNA extraído. A amostra de RNA (1  $\mu\text{g}$ ) foi previamente misturada com 2  $\mu\text{L}$  de tampão amostra composto por 75% formamida ( $\text{CH}_3\text{NO}$ ), 0,9% de formaldeído ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) em tampão contendo Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico (MOPS) com bromofenol ( $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ ), aplicada no gel desnaturante (1,5% de agarose, 7,5% formaldeído em tampão MOPS). O formaldeído foi adicionado após prévio resfriamento do gel, para não evaporar. A corrida foi em torno de 50 min a 80 Volts (V).

#### **6. Síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA).**

Para obtenção de cDNA, 5  $\mu\text{g}$  de RNA tratado foi incubado com 10 mM de uma mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP), 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de oligonucleotídeos dT ou hexâmeros randômicos em volume suficiente para 10  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase. Após 5 min a 65 °C a amostra foi colocada em gelo por 1 min. Em seguida foi adicionado 9  $\mu\text{L}$  de uma solução de 2  $\mu\text{L}$  de tampão 10x concentrado, 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 2  $\mu\text{L}$  de uma solução 0,1 M de ditioneitol (DTT) e 1  $\mu\text{L}$  de inibidor de RNase. Após incubação de 2 min a 42 °C foi acrescentado 50 U de enzima transcriptase reversa (SuperScript II RT – Invitrogen) e então incubadas por 50 min a 42 °C e 15 min a 72 °C. Os respectivos controles negativos da transcriptase reversa foram feitos, nos quais a enzima não foi adicionada. As amostras foram colocadas no gelo. Para degradar o RNA restante foi acrescentado à amostra 1  $\mu\text{L}$  de RNase H e incubados por 20 min a 37° C. A amostra foi guardada a -20 °C até o momento do uso.

## **7. Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT- PCR) para amplificação da sequência da gp43.**

Para RT-PCR foram utilizados os seguintes iniciadores específicos para a sequência da gp43: 5' CTCGAGGAGTTCGGTAGGTTCTCATCTCACGTCGCATCTC 3' e 5' GCGGCCGCTCACCCCTGCATCCACCATAC 3'. Foi utilizado 18 µL de PCR supermix (Invitrogen), 1 µL de cDNA e 0,5 µL de cada iniciador. A reação de amplificação foi realizada em termociclador e iniciou com a desnaturação das fitas duplas do DNA molde durante 2 min a 94 °C. Após 35 ciclos de: 30 s a 94 °C, 45 s a 55 °C e 1 min 30 s a 72 °C e a reação terminou após 5 min de polimerização a 72 °C. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão tris-acetato-EDTA (TAE), aplicando 100 V por 50 min.

## **8. Purificação da banda correspondente a sequência da gp43 do gel de agarose.**

O RT-PCR foi repetido com um volume maior. Utilizamos 45 µl de PCR supermix (Invitrogen), 2,5 µL de cDNA e 1,25 µL de cada iniciador. A reação de amplificação foi realizada como descrito anteriormente. Após correr o gel de 1% de agarose, a banda correspondente a sequência da gp43 foi cortada com bisturi e transferida para um tubo previamente pesado. Após transferência, o mesmo foi pesado novamente e o peso correspondente da banda (peso depois de colocar a banda - o peso do microtubo vazio), foi utilizado para calcular os volumes a serem utilizados para purificação do cDNA contido na banda.

Para purificação, foi utilizado o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Cat. 28704, QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. Foi adicionado às amostras 3x o volume do material contendo no tubo, de tampão de solubilização composto por 5.5 M tiocianato de guanidina (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>S); 20 mM Tris-ácido clorídrico (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> - HCl) pH 6.6. As mesmas foram incubadas a 50 °C por 10 min (até que o gel se dissolva). Quando o gel estava completamente dissolvido, verificou-se que o líquido continuava com a coloração amarela. Se a cor da mistura estivesse alaranjada ou violeta, adicionaríamos 10 µL de acetato de sódio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) 3 M, para que a cor voltasse ao normal. As amostras foram passadas pela coluna do kit e centrifugadas a 13000 rotações por minuto (rpm) por 1 min à temperatura ambiente, e esse procedimento foi repetido duas vezes. Para lavar a coluna, foram adicionados 750 µL de solução 10 mM Tris-HCl pH 7.5 em 80% etanol à coluna em repouso por 2 a 3 min, e depois centrifugamos por 1 min. O líquido foi descartado e a coluna novamente centrifugada. Após essa etapa, a coluna foi transferida para um tubo limpo de 1,5 mL. Para eluir o DNA,

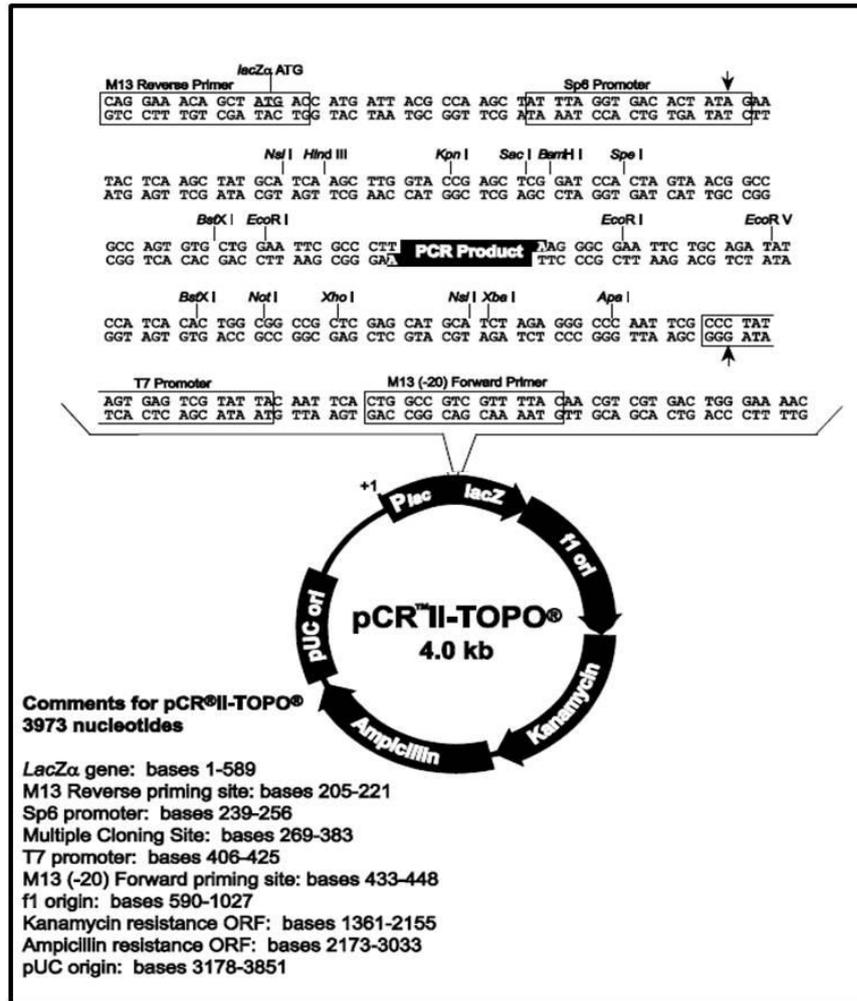
adicionamos 20  $\mu\text{L}$  do tampão de eluição (Tris 10 mM, pH 8,5) pré-aquecido no centro da coluna. Após repouso por 30 min, o tubo foi centrifugado por 1 min e a amostra coletada em tubo limpo. Um gel de agarose 1% foi corrido com 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra para avaliar a integridade de mesma.

### **9. Adição de adenina (A) na extremidade 3' do cDNA.**

Para adicionar adenina na sequência da gp43, utilizamos uma enzima Taq DNA polimerase que não faz o mecanismo de correção, que consiste numa atividade 3'-5' exonuclease. Foi adicionado então 9  $\mu\text{L}$  do produto de RT-PCR, 0,25  $\mu\text{L}$  de dATP 10 mM, 1,25  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR 10x concentrado, 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase, e água deionizada em Sistema miliQ (Millipore Corporation) em quantidade suficiente para 12,5  $\mu\text{L}$ . A mistura foi incubada a 72 °C por 20 min. Nesse processo ficamos com um volume final de 12,5  $\mu\text{L}$ , ou seja, o produto de PCR foi ligeiramente diluído.

### **10. Vetores**

O vetor utilizado para clonagens das porções codificantes está representado na figura a seguir:



**Figura 6. Vetor de clonagem e sub-clonagem.** Representação esquemática do vetor utilizado para clonagem da porção codificante do gene da gp43- pCR<sup>®</sup> 2.1- TOPO (Invitrogen).

### 11. Ligação da seqüência da gp43 no vetor pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO (TA Cloning Kit).

Para clonar o inserto de gp43 no pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO, foi realizado um cálculo estimado da quantidade de produto de RT-PCR que seria necessário para ligar a 50 ng do vetor:

$$\text{ng do produto de RT-PCR} = \frac{(\text{pb do produto de PCR}) (50 \text{ ng do vetor pCR}^{\text{®}}2.1\text{-TOPO})}{\text{Pb do vetor} \sim 3900}$$

Pares de bases (pb) do produto de RT-PCR ~ 1200

Porém a razão que utilizada foi de 3 do inserto: 1 vetor.

\*\* Não deve-se usar mais que 2-3  $\mu\text{L}$  do produto de RT-PCR na reação de ligação, pois os sais da amostra podem inibir a enzima T4 DNA ligase.

## **12. Preparação de bactérias competentes para transformação**

Uma colônia isolada de bactéria que cresceu por 18 horas (h) a 37 °C em placa de ágar Luria-Bertani (LB), sem antibiótico, foi inoculada em 5 mL de caldo LB por 18 h à 37 °C sob agitação orbital. O pré-inóculo foi diluído na proporção de 1:40 em 200 mL de caldo LB e incubado sob agitação orbital a 37 °C até atingir a  $DO_{600nm}$  entre 0,5 e 0,8. Nesse momento o frasco foi retirado da incubadora e deixado no gelo por 30 min. As células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a 4 °C e depois ressuspensas cuidadosamente em 75 mL de tampão 0,1 M de cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ), previamente esterilizado por filtração em membrana de 25  $\mu m$  sob fluxo laminar, e incubadas no gelo 1-12 h. Passado esse período, foram novamente centrifugadas (3000 rpm por 10 min, a 4 °C) e ressuspensas cuidadosamente em 2 mL de tampão  $CaCl_2$  0,1 M com 15% de glicerol ( $C_3H_8O_3$ ), também estéril e colocadas em alíquotas de 50  $\mu L$ , incubadas no gelo seco e estocadas a -80 °C.

## **13. Transformação bacteriana por choque térmico.**

Aproximadamente 5  $\mu L$  do produto das reações de ligação ou 1  $\mu L$  da solução de DNA foram adicionados a 20  $\mu L$  de bactérias competentes, 75  $\mu L$   $CaCl_2$  a 0,1 M e incubadas em gelo durante 30 min. Após choque térmico a 42 °C por 35 s, adicionamos 500  $\mu L$  de caldo LB à temperatura ambiente. As bactérias foram incubadas durante uma hora a 37 °C sob agitação a 200 rpm para recuperação da parede bacteriana. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 500 giros (g) por 2 min, e 400  $\mu L$  do sobrenadante foram desprezados. O restante (200  $\mu L$ ) foi homogeneizado e plaqueado em ágar LB contendo 100  $\mu g/mL$  de ampicilina, 40  $mg/mL$  de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranoside (Xgal) e 100 mM de isopropil-beta-D-tiogalactopiranoside (IPTG) e incubadas em estufa a 37 °C durante 16 horas.

## **14. Seleção das colônias transformadas.**

Após incubação de 16 h, as placas foram colocadas em geladeira e depois de aproximadamente 8 h as mesmas foram retiradas e foi verificada a presença de colônias azuis e brancas. O plasmídeo pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO possui um gene lac Z que produz a enzima chamada beta-galactosidase. A presença desta enzima faz com que a colônia da bactéria que tem em seu interior este plasmídeo seja azul quando colocada em presença do composto químico Xgal. Isto ocorre porque a quebra do composto químico Xgal pela enzima beta-galactosidase forma um produto colorido, de cor azul. Assim, quando há a introdução de um fragmento de DNA exógeno nesta região do plasmídeo, o gene que produz a enzima beta-galactosidase é

destruído. Sendo assim, as colônias de bactérias que possuem o plasmídeo com a enzima betagalactosidase intacta em seu interior irão produzir colônias azuis, enquanto a colônia de bactéria que possuir o plasmídeo que teve a enzima beta-galactosidase destruída irá produzir colônias brancas.

Dessa forma, as colônias brancas foram selecionadas e crescidas em tubo falcon contendo 5 mL de caldo LB com 100 µg/mL ampicilina. Este tubo foi incubado sob agitação a 37 °C e 200 rpm por 16 h, e os mesmos foram utilizados para minipreparação plasmidial.

### **15. Extração do DNA plasmidial para análise das colônias bacterianas.**

As colônias de bactérias contendo o inserto de interesse foram inoculadas em 5 mL de caldo LB contendo 100 µg/ml de ampicilina, e incubadas a 37 °C sob agitação constante de 200 rpm, durante 16 h. Posteriormente o precipitado bacteriano foi lisado para obtenção de DNA plasmidial por cromatografia de troca iônica em coluna, com pequenas modificações nas instruções do fabricante (Quiaprep Spin Miniprep Kit - Cat. 27106). A suspensão bacteriana foi centrifugada por 20 min a 13000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano foi ressuspenso em 250 µL de tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA gelado, vortexado e transferido para microtubo. As bactérias foram lisadas com 10 mL de tampão de lise composto por 200 mM de hidróxido de sódio (NaOH) e 1% de dodecil-sulfato de sódio (SDS) e incubadas, com homogeneização frequente, por no máximo 5 minutos à temperatura ambiente. O lisado de bactérias foi neutralizado adicionando-se 350 µL de solução de neutralização com 4.2 M hidrocloreto de guanidina (CH<sub>5</sub>N<sub>3</sub>.HCl) 0.9 M de acetato de potássio (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K) pH 4.8, invertendo imediatamente e gentilmente (a solução fica com aparência de nuvem, com grumos brancos). A solução foi incubada durante 10 minutos em banho de gelo (o intervalo pode ser maior). Após centrifugação durante 10 min a 13000 rpm, os fragmentos celulares foram precipitados e o DNA permaneceu em solução. O sobrenadante foi transferido para coluna de troca iônica. A coluna foi centrifugada por 1 min a 13000 rpm. O líquido foi guardado juntamente com o precipitado da etapa anterior. A coluna foi lavada com 750 µL de tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 7.5 80% etanol). O DNA plasmidial foi eluído com 50 µL de tampão 10 mM Tris-Cl, pH 8.5 de pré-aquecido adicionado no centro da coluna e este ficou em repouso por 15-30 min. Após incubação, as colunas foram centrifugadas durante 2 min a 13000 rpm. A solução contendo o DNA plasmidial foi armazenada a -20 °C até o uso.

## 16. Hidrólise do DNA plasmidial com XhoI e NotI.

Para confirmar se o plasmídeo realmente continha o inserto, foi feita a hidrólise do mesmo com as enzimas XhoI e NotI, que correspondem aos sítios de ligação da sequência da gp43 ao plasmídeo. Para cada amostra utilizamos 2 U/ $\mu$ L da enzima XhoI, 2 U/ $\mu$ L da enzima NotI, 2  $\mu$ L de tampão contendo 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100 $\mu$ g/ml de albumina de soro bovino (BSA) em água deionizada e pH 7.9, em quantidade suficiente para 20  $\mu$ L. Os tubos foram incubados por 2 horas a 37 °C. Após a incubação, foi corrido um gel 1% de agarose, por aproximadamente 40 min a 110 V.

## 17. Sequenciamento de DNA plasmidial

Os sequenciamentos foram realizados pelo método da terminação da cadeia por ddNTPs (SANGER et al., 1977) e adaptado para sequenciador automático. Os primers utilizados no sequenciamento dos fragmentos gênicos clonados foram:

M13 1- 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'

2- 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

gp43 1- 5' CTCGAGGAGTTCGGTAGGTTCTCATCTCACGTCGCATCTC3'

2- 5' GCGGCCGCTCACCCCTGCATCCACCATAC3'

As reações de sequenciamentos foram realizadas em microtubos utilizando entre 100 ng e 200 ng de DNA plasmidial e o reagente *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems), uma solução contendo a enzima DNA polimerase e dNTPs, sendo cada base nitrogenada ligada a diferentes fluoróforos. O DNA obtido após a reação de PCR foi precipitado, por desidratação, utilizando 90  $\mu$ L de isopropanol 66% por 15 min à temperatura ambiente. Passado esse período foram submetidos à centrifugação por 20 min a 15300 g e o sobrenadante foi retirado com micropipeta. As amostras foram lavadas com etanol 70% e novamente centrifugadas por 10 min a 15300 g. Após o descarte do sobrenadante, o DNA precipitado foi estocado a -20 °C e entregue para sequenciamento no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II, na Universidade de São Paulo.

## 18. Estratégia para retirada do intron na sequência da gp43.

Após o sequenciamento, foi verificado que a sequência possuía um intron. Dessa forma, foram desenhados novos iniciadores para amplificar separadamente a região antes do intron e a região posterior ao intron. Foram realizadas duas reações de PCR, sendo que na primeira foi utilizado o iniciador gp43-1 e o iniciador gp43 intron-1 (5' GGT TTTGGGAACCCGG ACCATGGAGATCGATGAC 3'). Na segunda utilizamos o

iniciador gp43 intron-2 (5' CATGGTCCGGGTTCCCAAACCGG 3') juntamente com o iniciador gp43-2. Após a amplificação dessas porções, foi corrido um gel, as bandas purificadas e os produtos foram utilizados como amostra para amplificação da gp43 completa sem o intron, e nessa reação, como iniciadores a gp43-1 e gp43-2.

### 19. Anelamento de P10 contendo os sítios de restrição *XhoI* e *NotI*.

As sequências correspondentes ao P10, um peptídeo da gp43 composto por 15 aminoácidos (QTLIAIHTLAIRYAN), com uma região de ligação e sítios de restrição foram adquiridas da Invitrogen:

P10 1: *XhoI* + P10+ stop+*NotI*

5'TCGAGGAGTTCGGTAGGTTCCAGACCCTGATCGCCATCGCCATCCACACC  
CTGGCCATCAGATCAGCCAACTGAGC 3'

P10 2: *NotI*+ stop+ P10+*XhoI*

5'GCGGCCGCTCAGTTGGCGTATCTGATGGCCAGGGTGTGGATGGCGATCA  
GGGTCTGGAACCTACCGAACTCC 3'

Para anelamento das mesmas foram utilizados 50 ng de cada DNA, 1,5 µL de solução de citrato salino (SSC) 20x concentrado (175 g de NaCl, 88,22 g de Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, água destilada em quantidade suficiente para 11 µL, pH 7,0) e água miliQ em quantidade suficiente para 40 µL. Essa amostra foi incubada a 95 °C por 5 min e em repouso em temperatura ambiente até o resfriamento.

### 20. Clonagem da sequência de DNA da gp43 e da sequência do P10 sintético em fusão com as sequências dos anticorpos αDEC-205.

Plasmídios contendo as cadeias leves e pesadas dos anticorpos αDEC-205 foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Sílvia Boscardin do Instituto de Ciências Biológicas da USP e os plasmídios contendo o gene para gp43 (como descrito no item 7) foram previamente clonados em pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO. As sequências correspondentes às fases de leitura aberta do gene da gp43 e da sequência do P10 foram clonadas em fusão com a porção C-terminal do gene da cadeia pesada de cada um dos anticorpos. Para a clonagem foram utilizadas as enzimas de restrição *XhoI* e *NotI*, exatamente como descrito anteriormente (HAWIGER *et al.*, 2001). As bactérias contendo os plasmídios recombinantes foram então crescidas em larga escala e purificados utilizando-se os kits *QIAGEN Plasmid Giga Kit* como descrito pelo fabricante.

## **21. Produção dos anticorpos quiméricos por transfecção transiente de células embrionárias de rim humano 293T (HEK 293T) e purificação dos mesmos à partir dos sobrenadantes das culturas.**

Células HEK 293T foram semeadas em placas de 10 cm de diâmetro em meio DMEM suplementado com 2 mM L-glutamina, 10 U/mL penicilina, 1mM piruvato de sódio e 5% de soro fetal bovino (SFB) com baixa concentração de IgG (Invitrogen). Após dois dias em cultura (quando a confluência estiver em torno de 80%), as células foram transfectadas utilizando-se 10 µg de cada um dos plasmídios, um que codifica a cadeia pesada dos anticorpos acoplada à porção codificante da gp43 ou P10, e um que codifica a cadeia leve kappa ( $\kappa$ ) dos anticorpos – foram colocados em solução contendo polietilenoimina (PEI) na concentração de 0,45 mg/mL em solução de NaCl 0,1 M por 10 min. Após esse período, foi adicionado 1 mL da solução à cada placa de cultura, por gotejamento (cadeia leve e pesada) na presença de fosfato de cálcio, como descrito por Jordan et al. (1996).

Após 7 dias em estufa a 37 °C com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), os sobrenadantes das culturas foram coletados, filtrados em filtros de 0,22 µm e então precipitados em uma solução contendo 60% de sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 4 °C por cerca de 16-18 h. Os precipitados foram coletados por centrifugação e re-dissolvidos em PBS. Após uma diálise de 4 horas em PBS, os anticorpos quiméricos foram purificados utilizando-se *beads* de proteína G (Amersham-Pharmacia) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. A integridade dos anticorpos foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras seguido de coloração por solução de Azul de Coomassie G250 0,25%, Ácido Acético Glacial 10% e Etanol 45%. Os anticorpos quiméricos foram então estocados a -20 °C até uso.

## **22. Lise da parede celular para liberação dos anticorpos híbridos fusionados a gp43.**

Para realizar a lise das células e liberação dos anticorpos ligados a parede, após 7 dias de cultura, as células foram transferidas para tubo falcon, centrifugadas e ressuspensas em tampão de lise composto de 50 mM de fosfato monossódico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 300 mM NaCl, 0,05% tween20 (C58H114O26), pH ajustado com NaOH a 8,0 M, e quantidade de água suficiente para 1 L) utilizando a proporção de 500 µL de tampão para 10<sup>7</sup> células. As mesmas foram sonicadas no gelo da seguinte forma: 6 sonicações de 20 s a 50 Watts (W), com intervalos de 10 s. O lisado foi centrifugado a 5000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,22 µm, e a ele adicionado inibidor de protease na concentração de 1

mM. Os anticorpos quiméricos foram purificados utilizando-se *beads* de proteína G (Amersham-Pharmacia) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

### **23. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).**

A integridade dos anticorpos foi analisada em gel de SDS-PAGE em condições redutoras. Os géis confeccionados com 1 mm de espessura possuíam uma concentração de acrilamida de 5% no gel de empilhamento, e de 12% a 15% no gel de separação. O tampão com agente redutor 5x concentrado (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,3%, glicerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) 20%, β-Mercaptoetanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO) 25% e SDS 4%) foi adicionado às amostras, e estas foram então aquecidas à 96 °C por 5 min. As eletroforeses foram efetuadas a 120 V, em tampão de corrida (Tampão Tris-HCl 25 mM, Glicina (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>) 200 mM e SDS 0,1%) à temperatura ambiente. Os géis foram corados com Azul de Coomassie por 1 h, e descorados com solução de ácido acético glacial (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) 10% e etanol 30%, até a visualização das bandas de proteínas

### **24. Reconhecimento de proteínas por *Western Blot*.**

Proteínas foram separadas por SDS-PAGE por 45 min a 100 V, na concentração de 12-15% de acrilamida, submetidas a condições redutoras com DTT. Após a separação foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL Nitrocellulose Membrane Amersham™), por 2 h a 200 V em tampão de transferência (Solução Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glicina 200 mM e Metanol (CH<sub>4</sub>O) 20%).

Depois de avaliada a eficiência de transferência, a membrana foi incubada com solução de bloqueio, contendo leite desnatado 5% em tampão fosfato salino (PBS) (8,5 g de NaCl, 1,55 g fosfato de sódio dihidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O), 2,3 g de fosfato monossódico hidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) e água (H<sub>2</sub>O) destilada q.s.p. 1000ml com pH 7,2 - 7,4) e Tween 20 0,05% por 2 h à temperatura ambiente, ou por 16 h no gelo, sob agitação orbital. Após sucessivas lavagens utilizando PBS com Tween 0,05%, a membrana foi incubada com anticorpo primário por 2 h à temperatura ambiente sob agitação orbital. Foram efetuadas três lavagens de 10 min cada, e o anticorpo secundário conjugado à HRP, foi adicionado na diluição de 1:10000, permanecendo por 1 h à temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando o kit quimioluminescência *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare-Amersham).

## 25. Ensaios de viabilidade dos anticorpos

Esplenócitos totais de camundongos C57BL/6 foram coletados, macerados e as células separadas utilizando *cell strainer* (BD Falcon 100  $\mu\text{m}$ ). Após a primeira lavagem os eritrócitos foram retirados utilizando solução de lise. Mantidas no gelo, a solução de células foi ressuspensa, e a quantidade de células estimada através da contagem da câmara de Neubauer, utilizando solução de azul de tripan, para observarmos a viabilidade das mesmas. As células foram incubadas com anticorpos que reconhecem e bloqueiam receptores da porção Fc na membrana das células, na concentração de 1:100. Após 15min foram plaqueadas  $5 \times 10^6$  células/poço e incubadas no gelo com três diferentes concentrações de anticorpos híbridos (10 $\mu\text{g/mL}$ , 1 $\mu\text{g/mL}$  e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ ). Após 40 min, as células foram lavadas com tampão de FACS (PBS com 3% SFB), e incubadas no gelo com anticorpo secundário  $\alpha\text{IgG1}$  conjugado ao fluoróforo ficoeritrina (PE). Passados mais 40 min as células foram lavadas, ressuspensas e adquiridas por citômetro de fluxo. Os resultados foram analisados utilizando programa FlowJo. Foram utilizados como controles positivos de ligação anticorpos híbridos  $\alpha\text{DEC-deltaN}$  e 33D1-MSP1<sub>19</sub> gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Silvia Beatriz Boscardin.

## 26. Imunização dos animais com os anticorpos quiméricos fusionados ao P10.

Os animais foram divididos em grupos. Cada grupo foi imunizado intraperitonealmente com uma combinação anticorpo e estímulo de maturação, sendo as doses escolhidas com bases em trabalhos anteriormente publicados:

Grupo 1: 5  $\mu\text{g}$  de  $\alpha\text{DEC/P10}$  e 50  $\mu\text{g}$  de poli I:C;

Grupo 2: 5  $\mu\text{g}$  de ISO/P10 e 50  $\mu\text{g}$  de poli I:C;

Grupo 3: 20  $\mu\text{g}$  de P10 e 50  $\mu\text{g}$  de poli I:C;

Grupo 4: somente 50  $\mu\text{g}$  de poli I:C.

## 27. Análise das células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ de animais imunizados com anticorpos híbridos pela técnica de ELISPOT.

Os ensaios de ELISPOT foram realizados 10 dias após uma única dose de anticorpo adicionado de poli I:C, e 15 dias após a dose de reforço, sendo que o intervalo entre as doses foi de 30 dias. Para o ensaio de ELISPOT, utilizou-se o kit *Ready-SET-Go!* (eBioscience) para detecção de INF- $\gamma$  e placas de nitrocelulose com 96 poços (MAIPS 4510, Millipore). No dia anterior a coleta dos baços dos camundongos, o anticorpo de captura 250 x concentrado, sob condições estéreis em capela de fluxo laminar, foi diluído em tampão estéril específico para a sensibilização da membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) da placa

de ELISPOT. Adicionados 100  $\mu$ L por poço da diluição do anticorpo, a placa foi incubada a 4 °C por 16-18 h. Passado esse período, possíveis sítios de ligação inespecífica, foram bloqueados, utilizando meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10 % SFB estéril, por 1 h à temperatura ambiente. Após o sacrifício dos animais, os baços foram retirados e macerados, utilizando *cell strainer* e as células obtidas foram lavadas com RPMI suplementado e centrifugadas a 1800 rpm a 4 °C por 5 min. Após contagem do número de células em câmara de Neubauer,  $3 \times 10^5$  células foram plaqueadas por poço e o meio contendo IL-2r, na concentração final de 30 U/mL, e o peptídeo P10 na concentração de 20  $\mu$ g/mL, foi adicionado aos seus respectivos poços. Para controle positivo foi utilizado meio contendo IL-2r e 2,5  $\mu$ g/mL de concanavalina A (Con A). Como controles negativos, foram utilizados somente IL-2r, ou estímulo *in vitro* com um peptídeo não relacionado (TEWETGQI). As células foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 h. Para remover quaisquer células residuais, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS com 0,05% de Tween 20 e após foi adicionado 100  $\mu$ L do anticorpo de detecção 250 x em cada poço. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada e aos poços adicionados streptavidina ligada a HRP 250 x. Após 45 minutos de incubação, a placa foi lavada e revelada utilizando substrato AEC (Becton Dickinson), por aproximadamente 30 min. As placas foram então secas à temperatura ambiente e os *spots* foram contados em contador automatizado (AID GmbH).

## **28. Detecção de citocinas a partir do sobrenadante de esplenócitos de animais imunizados e estimulados *in vitro* com o P10.**

Com o objetivo de verificar a produção de citocinas após estímulo com o P10, os esplenócitos de animais imunizados pela estratégia *prime-boost* foram plaqueados e em cada poço da placa de 96 poços, foi adicionado um estímulo: P10, um peptídeo não relacionado (TEWETGQI) ou nada como controles negativos, e como controle positivo utilizamos sempre a ConA. Após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -70 °C até o uso. As citocinas foram dosadas a partir do sobrenadante e a técnica utilizada foi ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de captura, utilizando-se anticorpos monoclonais de captura e detecção contra as citocinas, nas concentrações recomendadas pelo fabricante (RD Systems). Resumidamente, para realizar o procedimento, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura diluído em PBS e mantidas a 4 °C de um dia para o outro. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X-Tween 20 a 0,05%. Foi adicionado às placas, PBS contendo 1% de BSA, para promover o bloqueio de

sítios livres do plástico e mantido por 1 h à temperatura ambiente. As citocinas recombinantes, utilizadas para realizar a curva padrão, foram diluídas em PBS contendo 1% de BSA e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Os sobrenadantes de cultura foram também incubados em poços por este mesmo período, quando então todos os poços foram lavados 3 vezes com PBS - Tween 20 a 0,05%. Foram adicionados os anticorpos de detecção conjugados a biotina, diluídos em PBS 1% de BSA e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Os poços foram lavados 5 vezes. As placas foram incubadas com conjugado estreptoavidina-peroxidase por 20 minutos em temperatura ambiente e os poços lavados 3 vezes. A revelação foi realizada com 1 mg/mL de o-fenilenodiamina ( $C_6H_8N_2$ ), diluída em PBS, 0,4 M citrato de sódio 0,4 M pH 5,3, por 15-30 min. O bloqueio da reação foi feito com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 4N e a leitura das densidades ópticas (DO) em leitora automática, em comprimento de onda de 450 nm. As concentrações de cada citocina nos sobrenadantes foram calculadas com base na equação da curva de regressão polinomial, obtida a partir da curva padrão com citocinas recombinantes murinas.

### **29. Preparo do inóculo de *P. brasiliensis* para desafio dos animais imunizados.**

Células fúngicas da cepa Pb18 foram coletadas em 10 mL de PBS, homogeneizadas gentilmente com auxílio de pipeta de bulbo, para desfazer os grumos, deixando-se decantar as partículas maiores. A suspensão mais leve, contendo células isoladas ou com poucos brotamentos, foi coletada com auxílio de seringa de insulina e transferidas para novo tubo. A contagem do número de células foi realizada utilizando-se câmara de Neubauer.

### **30. Desafio dos animais imunizados intratraquealmente com leveduras de *P. brasiliensis*.**

Os animais foram anestesiados com a administração de pré-anestésico + anestésico: 10 mL/Kg de peso de cetamida e xilasina a 2,5% pela via intraperitoneal. Após efeito anestésico, os mesmos foram infectados por injeção intratraqueal (i.t.) com suspensão contendo  $1 \times 10^5$  células/mL de leveduras viáveis de *P. brasiliensis* contidas em 50  $\mu$ l de PBS. Os animais foram acompanhados e ficaram sob aquecimento até a finalização do efeito do anestésico.

### **31. Terapia de animais infectados com *P. brasiliensis* utilizando anticorpos quiméricos.**

Os animais foram infectados intratraquealmente com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis*. Após 45 dias, os animais foram divididos em grupos. Cada grupo foi imunizado intraperitonealmente com uma combinação anticorpo e estímulo de maturação, sendo as doses escolhidas com bases em trabalhos anteriormente publicados:

Grupo 1: 5 µg de αDEC/P10 e 50 µg de poli I:C;

Grupo 2: αDECvazio e 50 µg de poli I:C;

Grupo 3: 5 µg de ISO/P10 e 50 µg de poli I:C;

Grupo 4: 5 µg de P10 e 50 µg de poli I:C;

Grupo 5: somente 50 µg de poli I:C;

Grupo 6: PBS;

Os mesmos receberam 3 doses com intervalos de 7 dias entre elas. Após 10 dias do término do tratamento, foram avaliados os órgãos dos mesmos quanto as unidades formadoras de colônias (UFC), análises histopatológicas e produção de citocinas.

### **32. Detecção de citocinas em baço, fígado e pulmão após ensaios de imunização e terapia.**

Após 15 e 30 dias de desafio, os animais foram sacrificados, e dos mesmos retirados o fígado, baço e pulmões. Os órgãos foram pesados, posteriormente macerados em 2 mL de PBS, e esse volume foi transferido para um microtubo, centrifugado a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, e centrifugado a rotação máxima por 15 min. O sobrenadante foi novamente transferido para novo tubo e o mesmo foi identificado e armazenado à -20 °C para dosagem de citocinas por ELISA no dia seguinte.

A dosagem de citocinas por ELISA foi realizada como descreve o fabricante RD Systems). Após quantificação das citocinas, foi calculada uma relação dos valores por grama de tecido que foi macerado.

### **33. Ensaio para determinação das Unidades Formadoras de Colônias em órgãos de animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com anticorpo quimérico αDEC/P10.**

O teste de UFC consiste no crescimento de leveduras de *P. brasiliensis* em meio sólido, à partir de órgãos macerados. Após o plaqueamento destes tecidos, contamos as colônias durante 3 semanas, para obtermos a quantidade de colônias por grama de órgão. O meio de cultura utilizado no plaqueamento se constitui de BHI suplementado com soro equino e 5% de filtrado de cultura do isolado 192 de *P. brasiliensis*, como fonte de fator de crescimento do fungo a ser isolado, além dos antibióticos penicilina (0,062 mg/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), conforme descrito por Castañeda et al. (1988) e Singer-Vermes et al. (1992).

### **34. Análise histopatológica**

Para a realização de lâminas histopatológicas, partes dos tecidos dos animais imunizados e infectados (pulmão, fígado e baço) foram retirados e colocados em soluções fixadoras, e posteriormente, foram enviadas a sessão de Patologia do *Albert Einstein College of Medicine* da *Yeshiva University*, para realização das mesmas, onde foram coradas por hematoxilina e eosina. Lâminas também foram coradas com nitrato de prata (Gomori) no Instituto de Ciências Biomédicas da USP, para melhor visualização das estruturas fúngicas. Secções histológicas foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico (200x e 400x).

### **35. Análise estatística.**

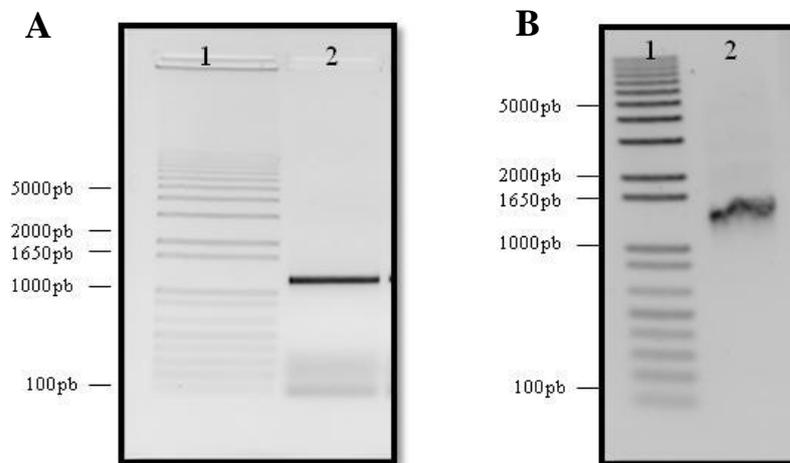
Análises estatísticas de significância foram realizadas através do teste ANOVA seguido de Bonferroni para comparação entre os diferentes grupos experimentais. Todos os testes foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5, e diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## ***IV. Resultados***

---

### Obtenção do DNA da gp43.

A cepa de Pb18 foi repicada em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-ágar, e após crescimento fizemos a extração do RNA total do fungo pelo método de Trizol. Aproximadamente 1 µg de RNA foi tratado com DNase e utilizado para reação de cDNA pela transcriptase reversa. Utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, amplificamos a porção codificante do gene da gp43, a partir do cDNA obtido (Figura 7A). A mesma foi retirada do gel e após purificação do DNA contido corremos um novo gel para avaliar a integridade da amostra (Figura 7B). Sítios para as enzimas XhoI e NotI foram inseridos na porção codificante para clonagem em vetor de expressão em procaritoto.

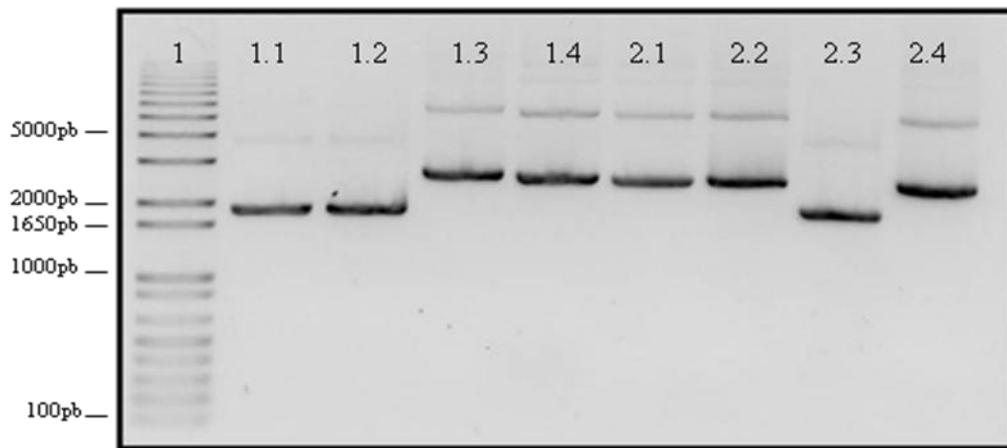


**Figura 7. RT-PCR para amplificação da sequência correspondente a gp43e purificação da banda contendo o DNA de interesse.** (A) A porção codificante do gene da gp43 foi amplificada, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, a partir do cDNA do extrato total de *P. brasiliensis*, e submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e corado com *gel red*. 1- 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, 2- Pode-se observar a amplificação de um produto de aproximadamente 1300 pb correspondente a porção codificante para gp43. (B) Após amplificação da sequência da gp43, a banda foi retirada do gel, e o DNA purificado com QIAquick Gel Extraction Kit (Cat. 28704 - QIAGEN). Após a purificação a amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% novamente para verificação da integridade da amostra. 1- 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, 2- Produto correspondente a sequência da gp43.

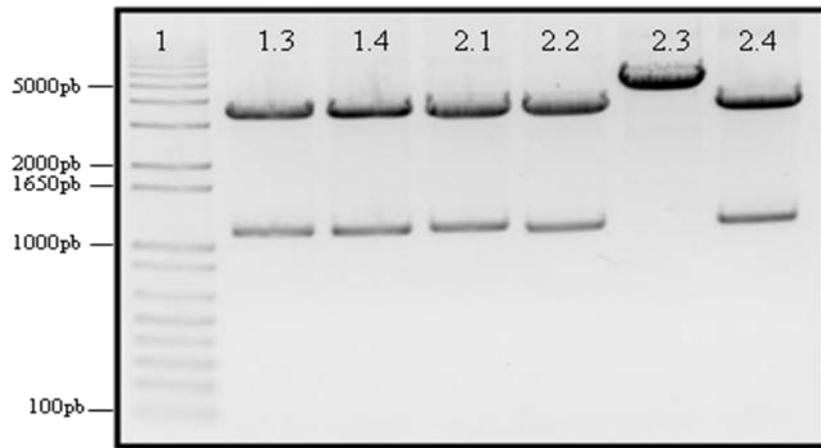
### Clonagem em vetor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO.

A porção codificante amplificada foi clonada em vetor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO e o produto da ligação vetor-inserto foi utilizado para transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , que após terem sido cultivadas em meio seletivo, contendo ampicilina, seu extrato celular foi utilizado para extração de DNA plasmidial utilizando lise alcalina. A análise do gel demonstrou que apenas 5 dos 8 clones selecionados possuíam um tamanho esperado do vetor ligado a sequência da gp43, sendo eles 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4 (Figura 8).

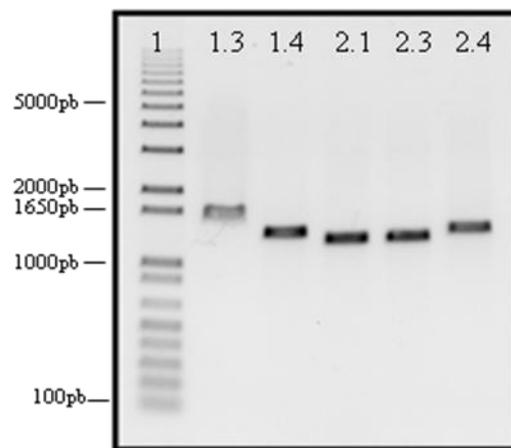
Os clones mencionados foram hidrolisados com XhoI e NotI quando pudemos observar a liberação do inserto de aproximadamente 1300 pb correspondente a porção codificante da gp43. Dos clones analisados observamos que apenas o clone 1 não apresenta a liberação do inserto e seu tamanho correspondente em pares de base se assemelha ao vetor vazio. Em todos os outros, podemos observar a presença do fragmento de 1300 pb (Figura 9). Desses analisados como positivos para análise por enzima de restrição, seguimos para análises por sequenciamento. As bandas correspondentes ao inserto foram cortadas e purificadas para posterior clonagem em vetor contendo as cadeias pesadas dos anticorpos  $\alpha$ DEC-205 e seu controle isotópico (Figura 10). Porém quando fizemos a análise do sequenciamento, verificamos que o clone 1.4 possuía 99% de similaridade com a sequência depositada no *Genbank* (Pb18-1 AY005429-1). Porém a mesma está descrita por possuir um íntron entre as bases 463 e 542. Dessa forma, desenvolvemos uma estratégia para retirada do mesmo.



**Figura 8. Purificação de DNA plasmidial por cromatografia de troca iônica em coluna após transformação bacteriana com produto de ligação pCR2.1-gp43.** Após ligação da sequência da gp43 ao vetor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO, fizemos a transformação bacteriana em *E. coli* DH5- $\alpha$ , e 8 colônias foram selecionadas e crescidas em caldo LB. Eletroforese em gel de agarose 1% e corado com *gel red*. 1- 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, 1.1 a 2.4 - DNA plasmidial purificado a partir de colônias transformadas.



**Figura 9. Análise de restrição utilizando as enzimas XhoI e NotI.** Análise dos clones por enzimas de restrição. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com gel red. 1- 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen. Seis dos clones obtidos para pCR2.1/gp43 foram submetidos à análise por enzima de restrição (1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4). Na hidrólise com as enzimas XhoI e NotI, observa-se a liberação do inserto, o que torna possível a correta análise do tamanho do clone em pares de base. Pode-se observar a liberação do inserto de aproximadamente 1300 pb, com ambas as enzimas de restrição, em cinco dos seis clones obtidos.

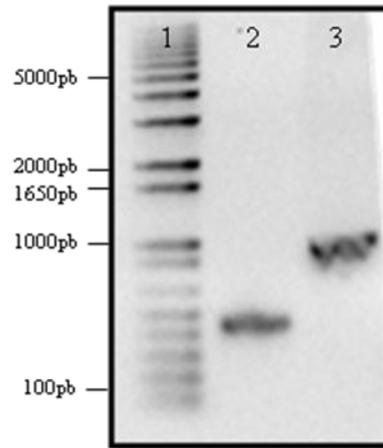


**Figura 10. Purificação do inserto liberado após análise de restrição com as enzimas XhoI e NotI.** Após hidrólise com as enzimas XhoI e NotI, dos clones pCR2.1/gp43 e liberação dos insertos, as bandas correspondentes a porção codificadora da gp43 foram cortadas, e o DNA purificado com QIAquick Gel Extraction Kit (Cat. 28704 - QIAGEN). Após a purificação as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% novamente para verificação da integridade da amostra. 1- 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen. 1.3 a 2.4 – DNA purificado após digestão do plasmídeo pCR2.1/gp43.

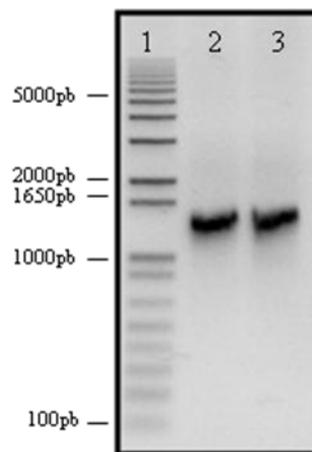
### **Estratégia para retirada do intron do clone 1.4 da gp43.**

Para retirarmos o intron da sequência obtida no clone 1.4 optamos por amplificar as porções anterior e posterior ao intron separadamente (Figura 11). Após obtenção dos DNAs dessas porções, fizemos um PCR para unir os fragmentos, utilizando cada porção como amostra na reação em uma proporção 1:1 e 2:1, já que o primeiro fragmento é menor. Em

ambas as reações verificamos a amplificação de uma sequência com aproximadamente 1300 pb (Figura 12).



**Figura 11. RT-PCR para amplificação da sequência correspondente a porção anterior e posterior ao intron na gp43.** Os fragmentos anterior (f1) e posterior (f2) a região do intron da gp43 foram amplificadas separadamente, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, a partir do cDNA do extrato total de *P. brasiliensis*, e submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e corado com gel red. 1- 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen. 2 e 3 - Pode-se observar a amplificação de um produto de aproximadamente 500 e 700 pb, respectivamente, correspondentes a f1 e f2 de gp43.



**Figura 12. RT-PCR para amplificação da sequência correspondente a gp43 sem o íntron.** A porção codificante do gene para gp43 foi amplificada, a partir dos fragmentos anterior e posterior ao íntron utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, submetida à eletroforese em gel de agarose 1% e corada com gel red. 1- 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen. 2 e 3 - Pode-se observar a amplificação de um produto de aproximadamente 1300 pb correspondente a porção codificante do gene da gp43.

### **Sub-clonagem da sequência da gp43 em plasmídios que codificam a cadeia pesada dos anticorpos $\alpha$ DEC-205 e seu controle isotópico.**

A sequência da gp43 obtida foi novamente clonada em pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO. As amostras foram sequenciadas para confirmação da homologia com a sequência da porção codificante da gp43 (Figura 13). Dessa forma, fizemos a ligação da porção correspondente a sequência da gp43, aos plasmídios que codificam a cadeia pesada dos anticorpos  $\alpha$ DEC-205 e seu controle isotópico. Após a ligação, fizemos a transformação das bactérias competentes e plaqueamos em meio LB seletivo. As colônias que cresceram foram submetidas a um PCR de colônia, no qual utilizamos primers específicos para o vetor utilizado (M13-1 e M13-2). Após eletroforese em gel de agarose, verificamos que na maioria das colônias houve a amplificação de uma banda de aproximadamente 1300 pb (Figura 14). Desses clones escolhemos um de cada plasmídio e o mesmo foi crescido em meio LB e fizemos a extração do DNA plasmidial (Figura 15). Esses clones também foram submetidos à análise por enzima de restrição utilizando as enzimas Xho I e Not I. A hidrólise (Figura 16) utilizando as enzimas de restrição Xho I e Not I liberou um fragmento de 1300 pb correspondente a porção codificante da gp43 nos clones escolhidos, tanto DEC205/gp43 quanto ISO/gp43.

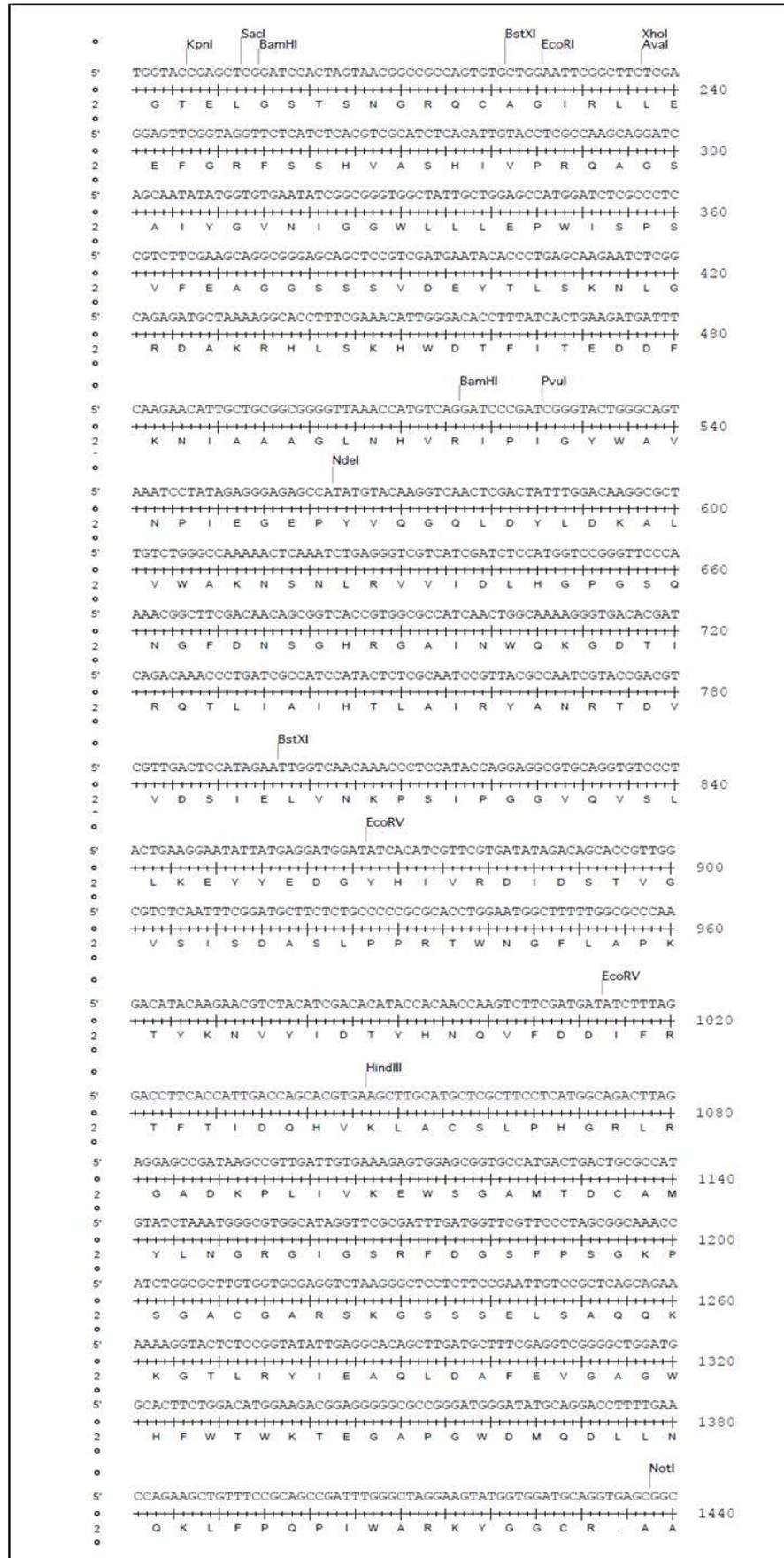
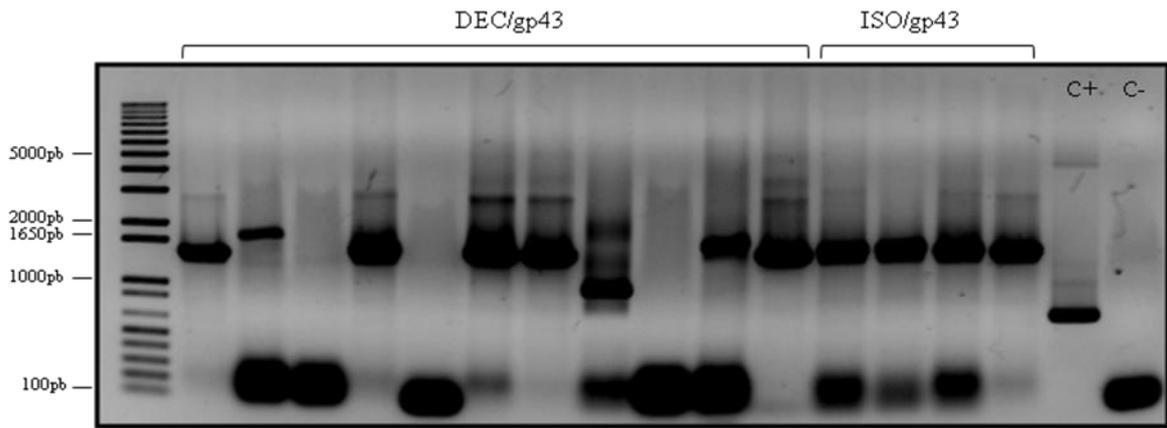
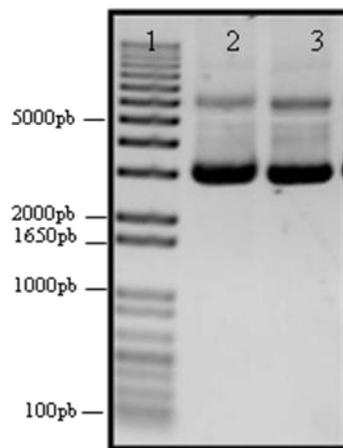


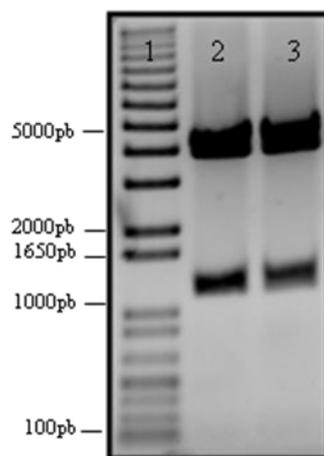
Figura 13. Representação esquemática da sequência codificante do gene da gp43 clonada em vetor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO.



**Figura 14. RT-PCR de colônias para amplificação do inserto.** Para triagem de clones contendo os insertos, submetemos as colônias que cresceram a um RT-PCR utilizando primers específicos para o vetor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO, situados anteriormente a região de inserção do DNA. 1- 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen. Verificamos que a maioria das colônias tiveram uma amplificação de uma sequência com aproximadamente 1500 pb.



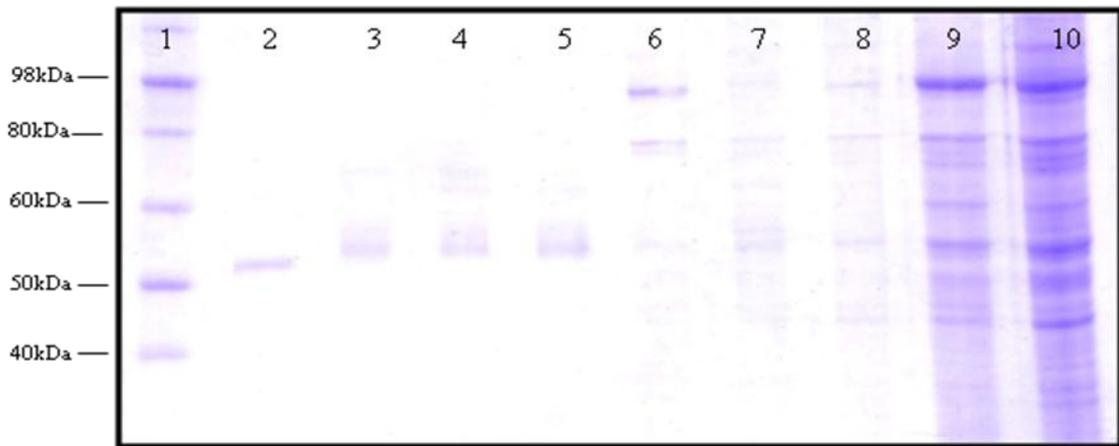
**Figura 15. Sub-clonagem da porção codificante da gp43 em vetor que expressa a cadeia pesada do anticorpo monoclonal  $\alpha$ DEC-205 e seu controle isotípico.** Após ligação da sequência da gp43 aos plasmídios pDEC e pISO, fizemos a transformação bacteriana, e duas colônias foram selecionadas e crescidas em caldo LB. Após crescimento, o DNA plasmidial foi purificado e as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% e corado com gel red. 1- 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen. 2 – pDECgp43; 3 - pISOgp43.



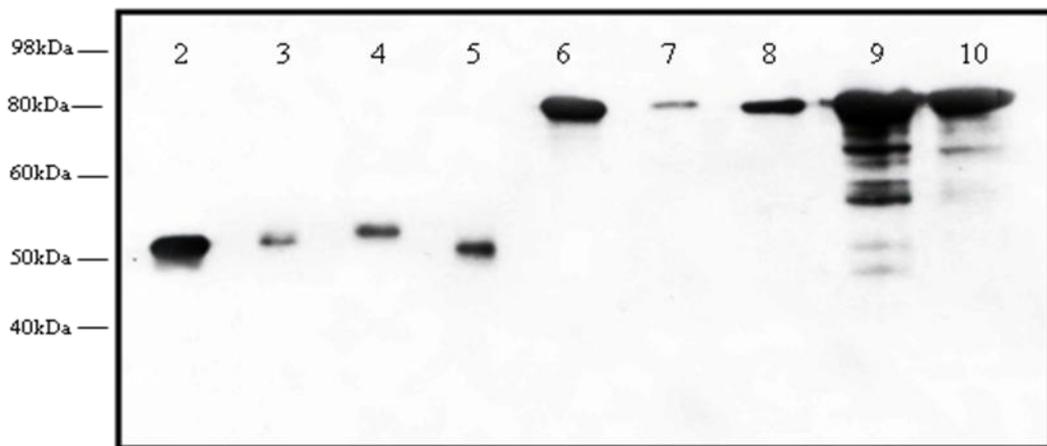
**Figura 16. Análise de restrição dos clones utilizando as enzimas Xho I e Not I.** Os produtos das hidrólises com as enzimas de restrição Xho I e Not I foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com *gel red*. Pode-se observar a liberação do fragmento correspondente a porção codificante da gp43. 1- 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen. 2 – pDECgp43; 3 - pISOgp43.

### Expressão dos anticorpos híbridos

Cerca de 2  $\mu$ g dos anticorpos híbridos,  $\alpha$ DEC205/gp43 e ISO/gp43 foram submetidas à SDS-PAGE, sob condições redutoras. A figura 17 mostra que nas amostras obtidas do sobrenadante das culturas celulares (amostras 3, 4 e 5), as cadeias pesadas dos anticorpos possuem em torno de 50 kDa, que coincide com a cadeia pesada do anticorpo não fusionado (amostra 2-  $\alpha$ DEC vazio). Já nas amostras liberadas após lise das células (amostras 6, 7 e 8), o tamanho da cadeia pesada está um pouco abaixo de 98 kDa, que é o tamanho esperado após a fusão com a gp43, porém é possível visualizar que uma grande quantidade de anticorpo ainda permanece ligado a membrana celular (amostras 9 e 10). As cadeias leves de ambos os anticorpos migram em torno de 25 kDa. A diferença de tamanho entre as cadeias leves do anticorpo  $\alpha$ DEC205 e ISO explica-se pela diferença no conteúdo dos aminoácidos em cada cadeia leve. Um western blot foi feito com as mesmas amostras utilizando como anticorpo primário um anticorpo  $\alpha$ IgG ligado à molécula de HRP. Assim foi possível verificar que houve um reconhecimento específico da cadeia pesada dos anticorpos híbridos (Figura 18).



**Figura 17. Análise da integridade dos anticorpos em gel de SDS-PAGE em condições redutoras seguido de coloração por Azul de Coomassie.** Alíquotas dos anticorpos híbridos foram submetidas à SDS-PAGE 12% sob condições redutoras utilizando DTT seguido por coloração por Azul de Coomassie. Amostra 2:  $\alpha$ DEC vazio; 3, 4 e 5: amostras obtidas do sobrenadante das células transfectadas respectivamente com pDEC/gp43, pISO/gp43 e 33D1/gp43; 6, 7 e 8: obtidas após lise celular, transfectadas como anteriormente; 9 e 10: precipitado resultante após lise celular.



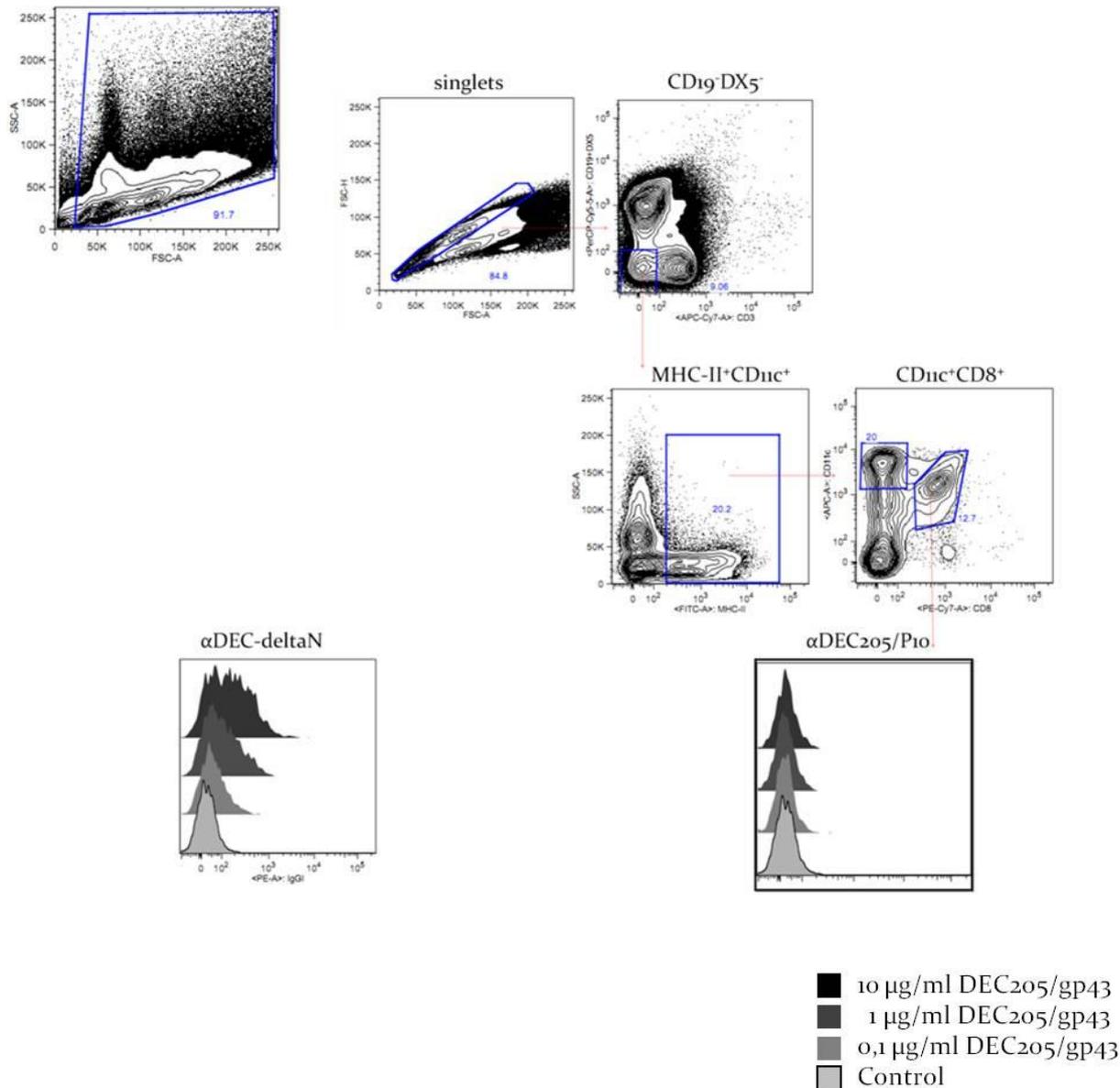
**Figura 18. Detecção de anticorpos 33D1/gp43, anti-DEC205/gp43 e ISO/gp43 em sobrenadantes e lisado de células HEK293T após 7 dias de transfecção.** Alíquotas dos anticorpos híbridos foram submetidas à SDS-PAGE 12% sob condições redutoras utilizando DTT. O mesmo foi utilizado para teste de reconhecimento por western blot, utilizando-se anticorpo  $\alpha$ IgG ligada à molécula de HRP. Amostra 2:  $\alpha$ DEC vazio; 3, 4 e 5: amostras obtidas do sobrenadante das células transfectadas respectivamente com pDEC/gp43, pISO/gp43 e 33D1/gp43; 6, 7 e 8: obtidas após lise celular, transfectadas como anteriormente; 9 e 10: precipitado resultante após lise celular.

### Caracterização do anticorpo $\alpha$ DEC205/gp43.

Nessa etapa, fizemos uma transfecção em uma escala maior para alcançar uma maior concentração de anticorpos, já que verificamos que o rendimento após a lise celular diminuiu drasticamente comparado a anticorpos que são liberados no sobrenadante naturalmente. Nosso próximo passo foi testar a viabilidade e especificidade da ligação do anticorpo monoclonal

$\alpha$ DEC205/gp43 a esplenócitos totais. Da mesma forma para controle positivo de ligação foram utilizados um anticorpo híbrido contendo a proteína de circumsporozoíta de *P. falciparum* denominado de  $\alpha$ DEC/ $\Delta$ N produzido e já caracterizados no Laboratório de Parasitologia do ICB-II, sob supervisão da Prof. Silvia Beatriz Boscardin, que reconhecem de forma específica o receptor DEC205 e DCIR de camundongo, respectivamente.

As células foram incubadas, primeiramente, com os anticorpos híbridos em diferentes concentrações (10  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL e 0,1  $\mu$ g/mL). Após sucessivas lavagens foram, então, incubadas com anticorpo  $\alpha$ IgG1 ligado ao fluoróforo PE. Fizemos também a marcação com diferentes anticorpos, a fim de selecionar somente as células dendríticas CD8<sup>+</sup> (DX5<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). As amostras foram posteriormente adquiridas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACSCANTO II (BD Biosciences). Após a análise observamos que não houve diferença nas médias de intensidade de fluorescência entre as diferentes concentrações e o controle (sem o anticorpo híbrido) (Figura 19).

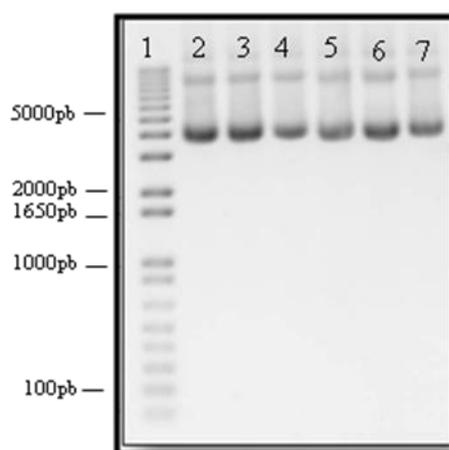


**Figura 19.** Ensaio de ligação do anticorpo  $\alpha$ DEC205/gp43 em células de baço de camundongos C57Bl/6 naive. Esplenócitos totais de camundongos foram incubadas com anticorpos híbridos em três concentrações (10ug/mL, 1ug/mL e 0,1ug/mL). Após incubação, os esplenócitos foram marcados com anticorpos anti-CD19, anti-MHCII, anti-DX5, anti-CD11c e anti-CD8. Através da estratégia de gating mostrada acima, selecionamos as células CD19-DX5MHCII+CD11c+ que consideramos como DCs clássicas, e subdividimos estas em duas populações, de acordo com a expressão da cadeia alfa da molécula CD8. A ligação das diferentes concentrações dos anticorpos às populações de DCs de interesse está mostrada nos histogramas utilizando-se um anticorpo anti-IgG1 de camundongo como secundário. Os números expressos na frente de cada histograma indicam as medianas de fluorescência (MFI). Utilizamos como controle positivo de ligação anticorpos híbridos  $\alpha$ DEC-deltaN gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Silvia Boscardin. \*Resultados obtidos a partir da análise de dois ensaios.

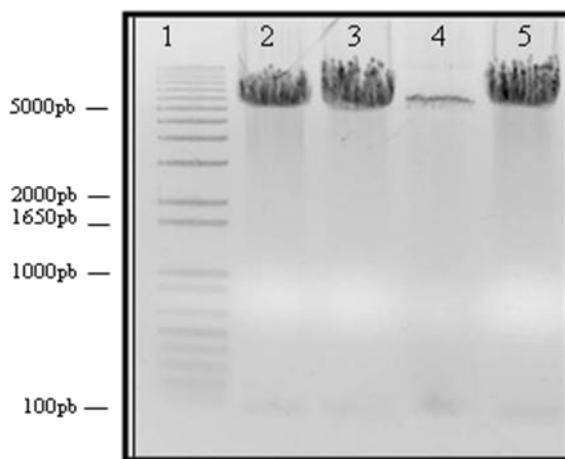
### Clonagem do P10 em plasmídios que codificam a cadeia pesada dos anticorpos $\alpha$ DEC-205 e seu controle isotípico.

Como os anticorpos fusionados a gp43 demonstraram problemas quanto à solubilidade, a o rendimento e a ligação com receptores específicos, optamos por iniciar o trabalho com um fragmento de aproximadamente 700 pb da gp43 e também com o P10, que vêm sem estudado em ensaios de vacinação e terapia.

Para o experimento com o P10, desenhamos sequências específicas que codificam esse peptídeo de 15 aminoácidos ligados a uma região de ligação entre esse peptídeo e a porção Fc do anticorpo e também sítios de restrição para facilitar a manipulação desses fragmentos, e esse DNA foi sintetizado por empresa especializada (Invitrogen). Após ligação do peptídeo aos plasmídios e transformação bacteriana, corremos um gel de agarose 1% e verificamos que os plasmídios selecionados possuíam um DNA plasmidial do tamanho esperado (Figura 20). Para confirmação fizemos a hidrólise com as enzimas *NheI* e *NotI*, e em gel de agarose, verificamos a liberação de um inserto pequeno, compatível com o tamanho esperado (Figura 21).



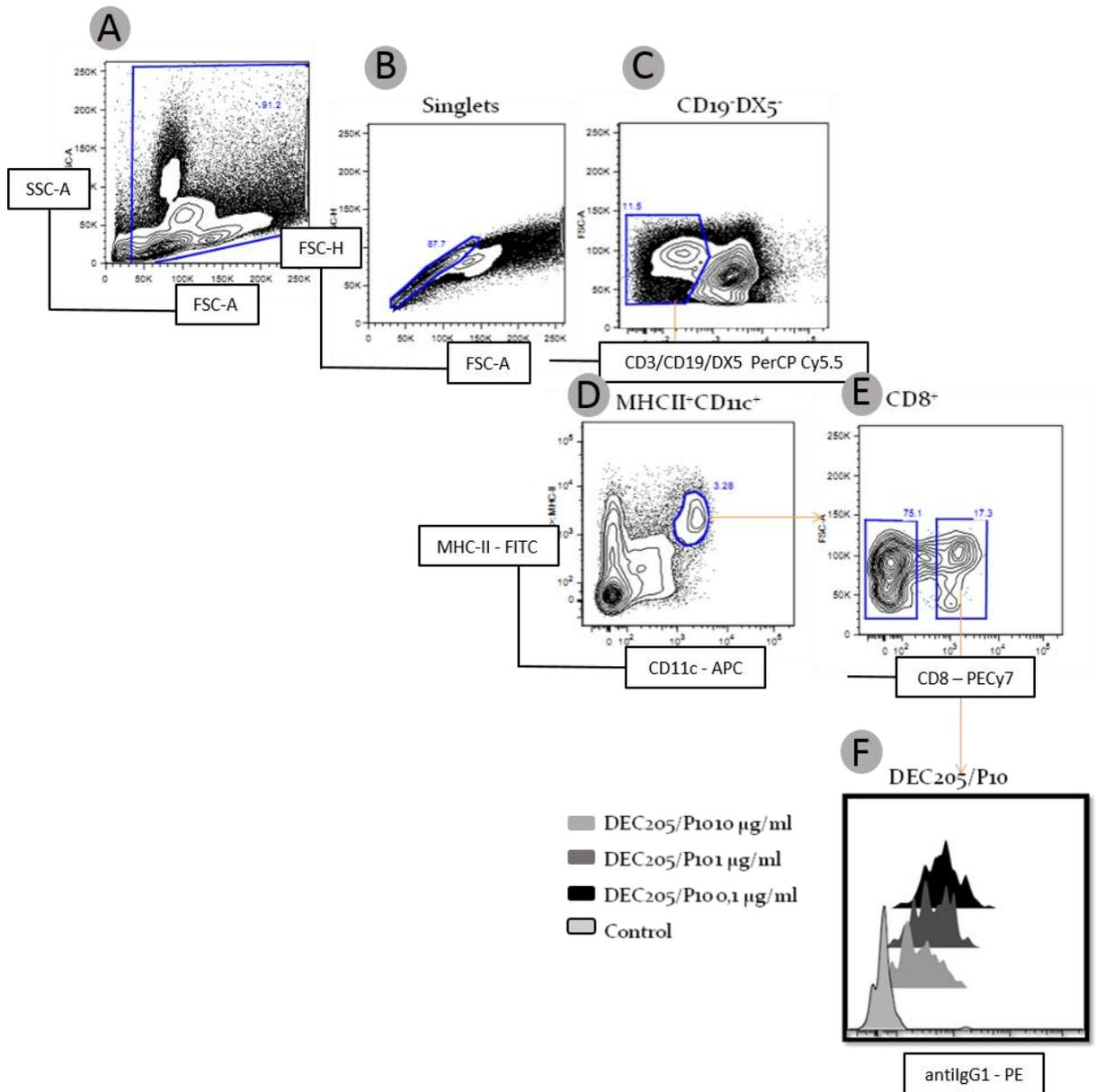
**Figura 20.** Purificação de DNA plasmidial por cromatografia de troca iônica em coluna após transformação bacteriana com produto de ligação da sequência de DNA do P10 em fusão com as sequências dos anticorpos anti-DEC 205 e seu controle isotípico. Após ligação da sequência do P10 aos plasmídios pDEC e pISO, fizemos a transformação bacteriana, e 6 colônias foram selecionadas e crescidas em caldo LB. Após crescimento, o DNA plasmidial foi purificado e as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% e corado com gel red. 1- 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen; 2, 3 e 4 – pDECP10; 5, 6 e 7 – pISOP10.



**Figura 21. Análise de restrição utilizando as enzimas *NheI* e *NotI*.** Análise dos clones por enzimas de restrição. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com *gel red*. Seis dos clones obtidos para DEC/P10 e ISO/P10 foram submetidos à análise por enzima de restrição. Na hidrólise com as enzimas *NheI* e *NotI*, observa-se a liberação do inserto de aproximadamente 100 pb. 1- 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen; 2 e 3 – pDEC205/P10; 4 e 5 – pISOP10.

### **Caracterização do anticorpo $\alpha$ DEC205/P10.**

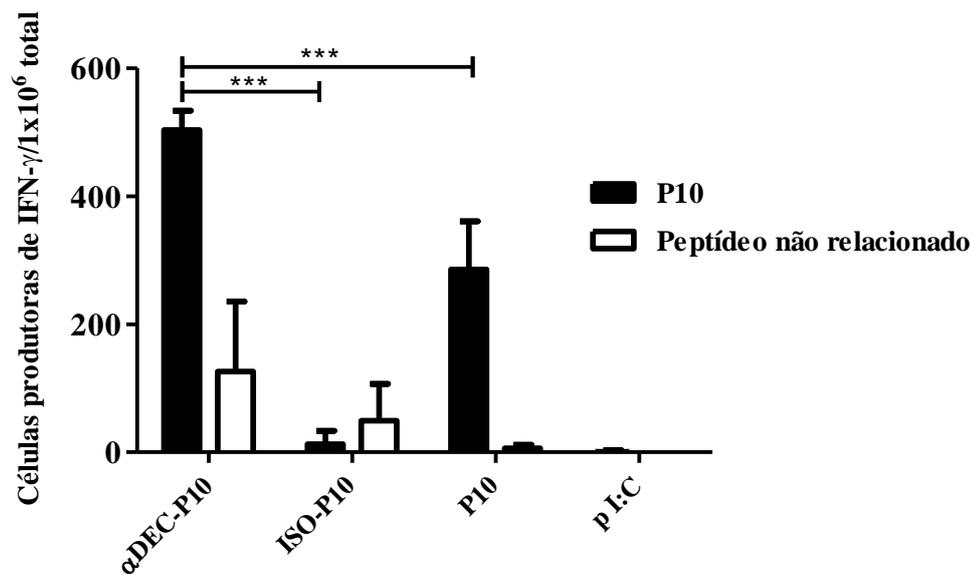
O anticorpo híbrido  $\alpha$ DEC/P10 foi produzido com sucesso. Fizemos uma transfecção em uma escala maior para alcançar a concentração de anticorpos desejada, e testamos a viabilidade e especificidade da ligação do anticorpo monoclonal  $\alpha$ DEC205/P10 a esplenócitos totais. Esplenócitos de camundongos foram incubados, primeiramente, com os anticorpos híbridos em diferentes concentrações (10  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL e 0,1  $\mu$ g/mL). Assim como descrito no item de caracterização do anticorpo  $\alpha$ DEC205/gp43, fizemos sucessivas lavagens e então, incubamos com anticorpo  $\alpha$ IgG1 ligado ao fluoróforo PE. Fizemos também a marcação com diferentes anticorpos a fim de selecionar somente as células dendríticas CD8<sup>+</sup> (DX5<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) e posteriormente adquiridas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACSCANTO II (BD Biosciences). Após a análise observamos que houve diferença nas médias de intensidade de fluorescência entre as diferentes concentrações e o controle (sem o anticorpo híbrido) e que a ligação foi dose-dependente confirmando a capacidade de ligação e especificidade dos anticorpos produzidos (Figura 22).



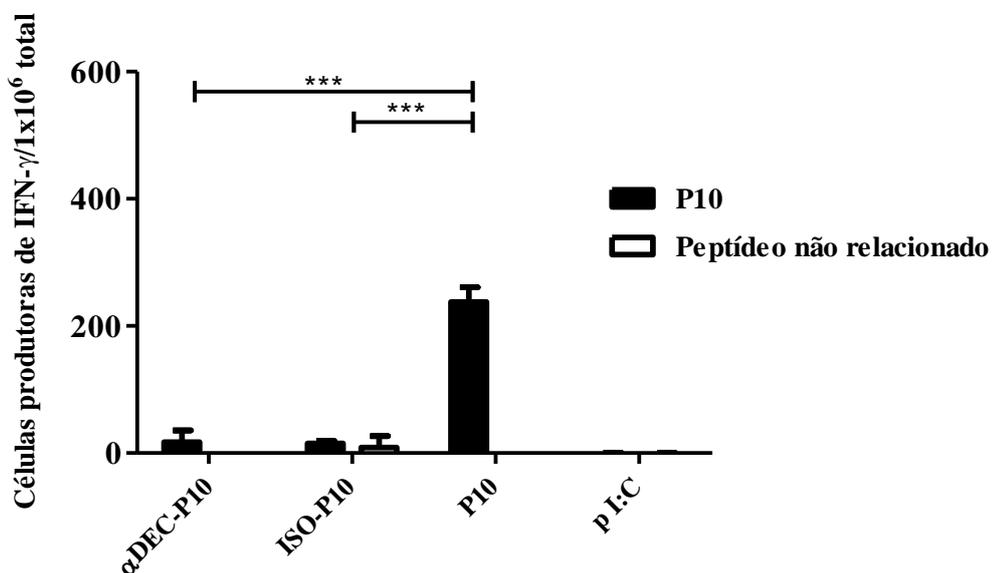
**Figura 22. Ensaio de ligação do anticorpo  $\alpha$ DEC205/P10 em células de baço de camundognos C57Bl/6 naive.** Esplenócitos totais de camundognos foram incubadas com anticorpos híbridos em três concentrações (10 $\mu\text{g/ml}$ , 1 $\mu\text{g/ml}$  e 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ). Após incubação, os esplenócitos foram marcados com anticorpos anti-CD19, anti-MHCII, anti-DX5, anti-CD11c e anti-CD8. A análise foi feita através da estratégia de *gating* a seguir: Células totais foram selecionadas excluindo os debris (A); *Doublets* (B) e células CD19<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup> (C). Células CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> (D) foram selecionadas e separadas pela expressão de CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (E). A análise foi realizada nas células CD19<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>. Os números dentro dos gráficos representam a porcentagem das células selecionadas. A ligação das diferentes concentrações dos anticorpos às populações de DCs de interesse está mostrada nos histogramas utilizando-se um anticorpo anti-IgG1 (F) de camundongo como secundário. \*Resultados obtidos a partir da análise de dois ensaios.

### **Avaliação da resposta específica, através de células produtoras de IFN- $\gamma$ após imunizações com os anticorpos quiméricos.**

Como sabemos da importância da citocina IFN- $\gamma$  na PCM, envolvida na proteção e na contenção da doença resolvemos então focar nossa atenção na resposta de células T CD4<sup>+</sup>, já que nosso peptídeo P10 é descrito como peptídeo de MHC II e dessa forma, um epítopo para a subpopulação de linfócitos citada. Iniciamos então experimentos de imunização dos camundongos que envolveram a administração de uma única dose intraperitoneal de 5  $\mu$ g de anticorpo  $\alpha$ DEC205/P10, ISO/P10 ou 20  $\mu$ g de P10 em presença de 50  $\mu$ g de poli I:C. O veículo utilizado foi PBS estéril e como controle, utilizamos um grupo administrado somente com o adjuvante em questão. Avaliamos a resposta celular em culturas de esplenócitos após 10 dias de imunização, reestimuladas com o peptídeo P10 (20  $\mu$ g/mL) ou com um peptídeo controle não-relacionado denominado TEWETGQI. Verificamos que uma única dose do anticorpo quimérico  $\alpha$ DEC205/P10 resultou numa resposta específica T CD4<sup>+</sup>, que foi significativamente maior que a imunização com o peptídeo sozinho (Figura 23). O mesmo foi feito com animais imunizados com duas doses de anticorpos, com intervalo de 30 dias entre as administrações, e a resposta verificada 15 dias após a segunda dose. Porém, a resposta visualizada primeiramente não se manteve após o boost, enquanto o P10 conseguiu induzir a mesma produção de células produtoras de IFN- $\gamma$  em relação aos demais grupos (Figura 24).



**Figura 23. Células produtoras de IFN- $\gamma$  detectadas 10 dias após imunização de animais BALB/c com anticorpos quiméricos.** Ensaio de ELISPOT, no qual esplenócitos de camundongos BALB/c, 10 dias após imunização com 5 $\mu$ g dos anticorpos quiméricos  $\alpha$ DEC/P10, P10 em presença de 50  $\mu$ g de Poli I:C, ou somente com Poli I:C, foram incubados na presença de 20 $\mu$ g/mL dos peptídeos P10 ou TEWETGQI (como controle negativo). O gráfico mostra o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  por milhão de esplenócitos. As barras representam as médias $\pm$ erros-padrão de 1 experimento feito em sextuplicata.\* representa diferença significativa e  $p < 0.05$ ,  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*).

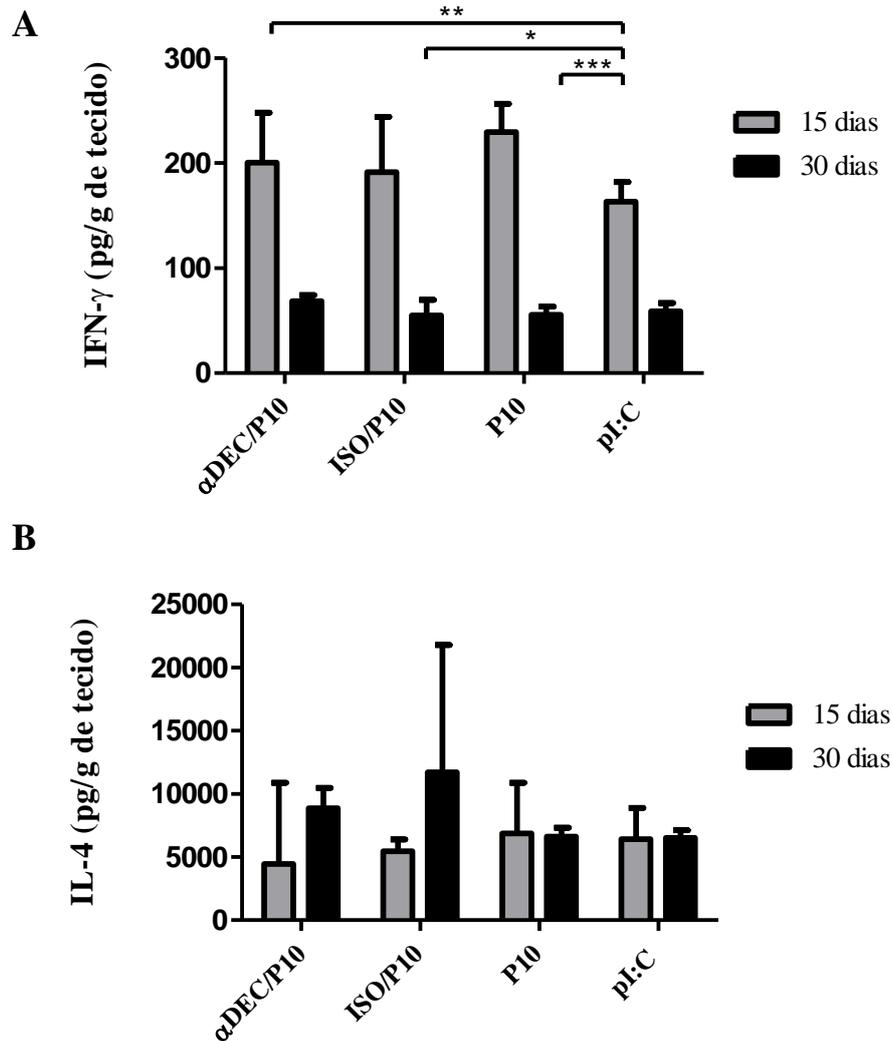


**Figura 24. Células produtoras de IFN- $\gamma$  em animais imunizados com anticorpos quiméricos, em ensaios de *prime* e *boost*.** Ensaio de ELISPOT, no qual esplenócitos de camundongos BALB/c, após duas imunizações com intervalo de 30 dias, com 5 $\mu$ g dos anticorpos quiméricos  $\alpha$ DEC/P10, P10 em presença de 50  $\mu$ g de p I:C, ou somente com Poli I:C, e 15 dias após a segunda dose foram incubados na presença de 20 $\mu$ g/mL dos peptídeos P10 ou TEWETGQI (como controle negativo). O gráfico mostra o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  por milhão de esplenócitos. As barras representam as médias $\pm$ erros-padrão de 1 experimento feito em sextuplicata.\* representa diferença significativa e  $p < 0.05$ ,  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*).

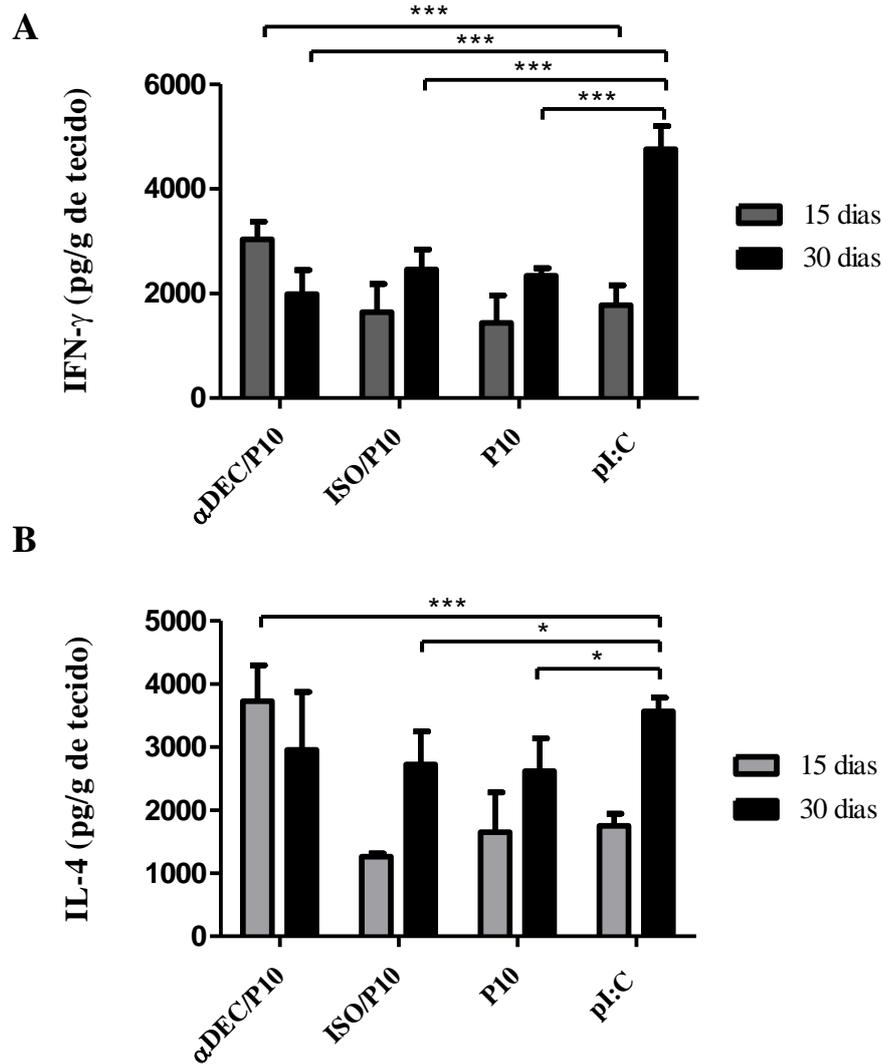
### **Produção de citocinas em órgãos de animais imunizados com anticorpos quiméricos e desafiados com leveduras de *P. brasiliensis*.**

Como verificamos que a imunização gerou uma resposta específica contra o peptídeo P10, decidimos desafiar os animais imunizados com leveduras de *P. brasiliensis* e verificar se a resposta induzida era capaz de proteger os animais da infecção. Para isso, os animais foram imunizados com duas doses de anticorpos quiméricos, ou P10 na presença de Poly I:C, com intervalo de 30 dias entre as doses. Após 30 dias da segunda dose, os mesmos foram infectados com  $1 \times 10^5$  leveduras do fungo pela via intra-traqueal. Os animais foram avaliados 15 e 30 dias após o desafio, e deles retirados o fígado, baço e pulmões. Esses órgãos foram macerados e o sobrenadante coletado para dosagem de ELISA. Verificamos que no baço houve uma produção maior de IFN- $\gamma$  após 15 dias do desafio, já após 30 dias, essa citocina ficou em nível próximo ao controle Poly I:C. Já a produção de IL-4 ficou em níveis muito próximos entre os grupos e entre os dias (Figura 25).

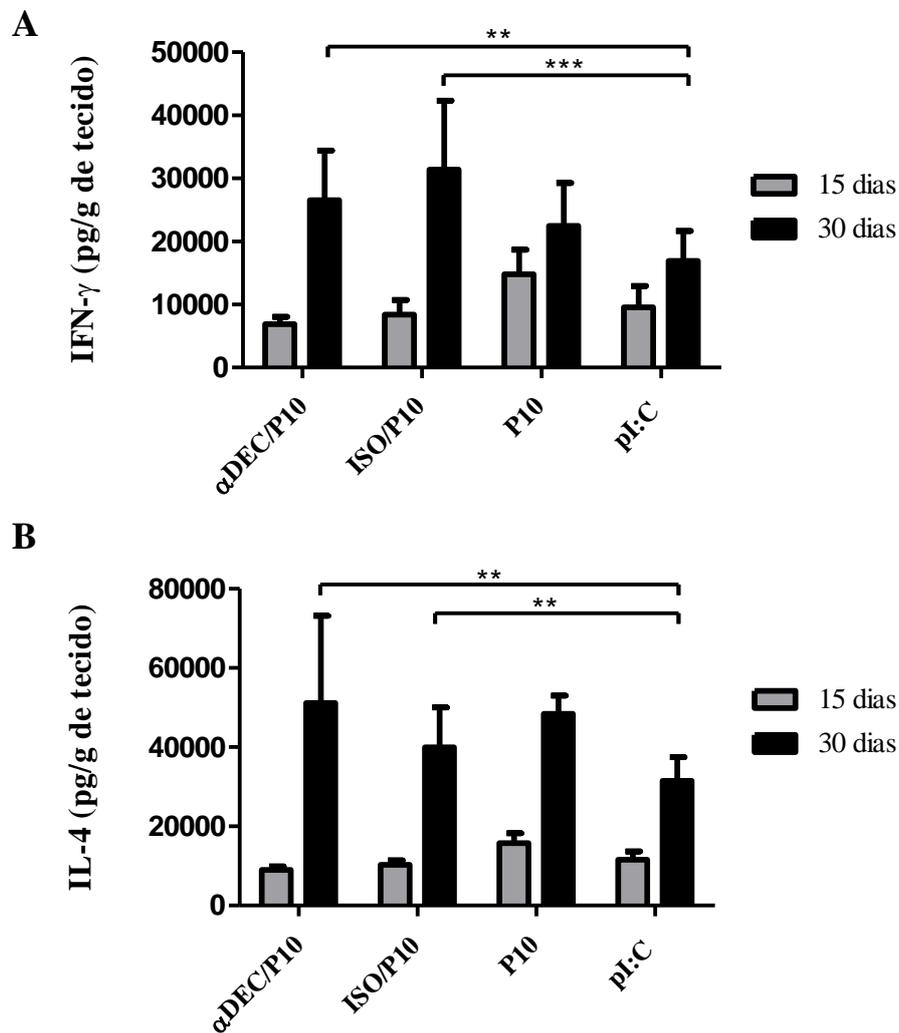
No fígado, entretanto, somente o grupo controle se destacou em relação aos outros grupos com maior produção de IFN- $\gamma$ , e a produção de IL-4 foi menor nos grupos imunizados com ISO/P10 e P10 em relação ao Poly I:C (Figura 26). No pulmão, o sítio principal de infecção, verificamos que os animais vacinados com  $\alpha$ DEC/P10 tiveram alta produção de IFN- $\gamma$  após 30 dias do desafio em relação ao controle onde foi administrado somente poly I:C (Figura 27). A concentração da citocina em relação aos outros órgãos também foi muito maior, em torno de 40.000 pg/g de órgão no pulmão, enquanto ficou próximo de 200 pg/g de órgão no baço, e 3.000 pg/g de órgão no fígado. A concentração de IL-4 no pulmão também foi maior nos grupos imunizados com  $\alpha$ DEC/P10 e ISO/P10 quando comparados ao controle nos quais foram administrados somente o adjuvante.



**Figura 25. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 em baço de animais imunizados e desafiados com *P. brasiliensis*.** Níveis de IFN- $\gamma$  (A) e IL-4 (B) produzidos pelo baço, por grama de órgão, dos animais imunizados com  $\alpha$ DEC/P10, ISO/P10, P10 na presença de p I:C e desafiados com  $1 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis*. As citocinas foram detectadas por ELISA no 15º e 30º dias após o desafio. Os resultados apresentam as médias  $\pm$  DP obtidos nos diversos tempos de infecção. A análise estatística foi realizada pelo Two-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Bonferroni. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*)



**Figura 26. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 em fígado de animais imunizados e desafiados com *P. brasiliensis*.** Níveis de IFN- $\gamma$  (A) e IL-4 (B) produzidos pelo fígado, por grama de órgão, dos animais imunizados com  $\alpha$ DEC/P10, ISO/P10, P10 na presença de p I:C e desafiados com  $1 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis*. As citocinas foram detectadas por ELISA no 15<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias após o desafio. Os resultados apresentam as médias  $\pm$  DP obtidos nos diversos tempos de infecção. A análise estatística foi realizada pelo Two-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Bonferroni. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*)



**Figura 27. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 em pulmão de animais imunizados e desafiados com *P. brasiliensis*.** Níveis de IFN- $\gamma$  (A) e IL-4 (B) produzidos pelo pulmão, por grama de órgão, dos animais imunizados com  $\alpha$ DEC/P10, ISO/P10, P10 na presença de pl:C e desafiados com  $1 \times 10^5$  leveduras de *P. brasiliensis*. As citocinas foram detectadas por ELISA no 15<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias após o desafio. Os resultados apresentam as médias  $\pm$  DP obtidos nos diversos tempos de infecção. A análise estatística foi realizada pelo Two-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Bonferroni. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*)).

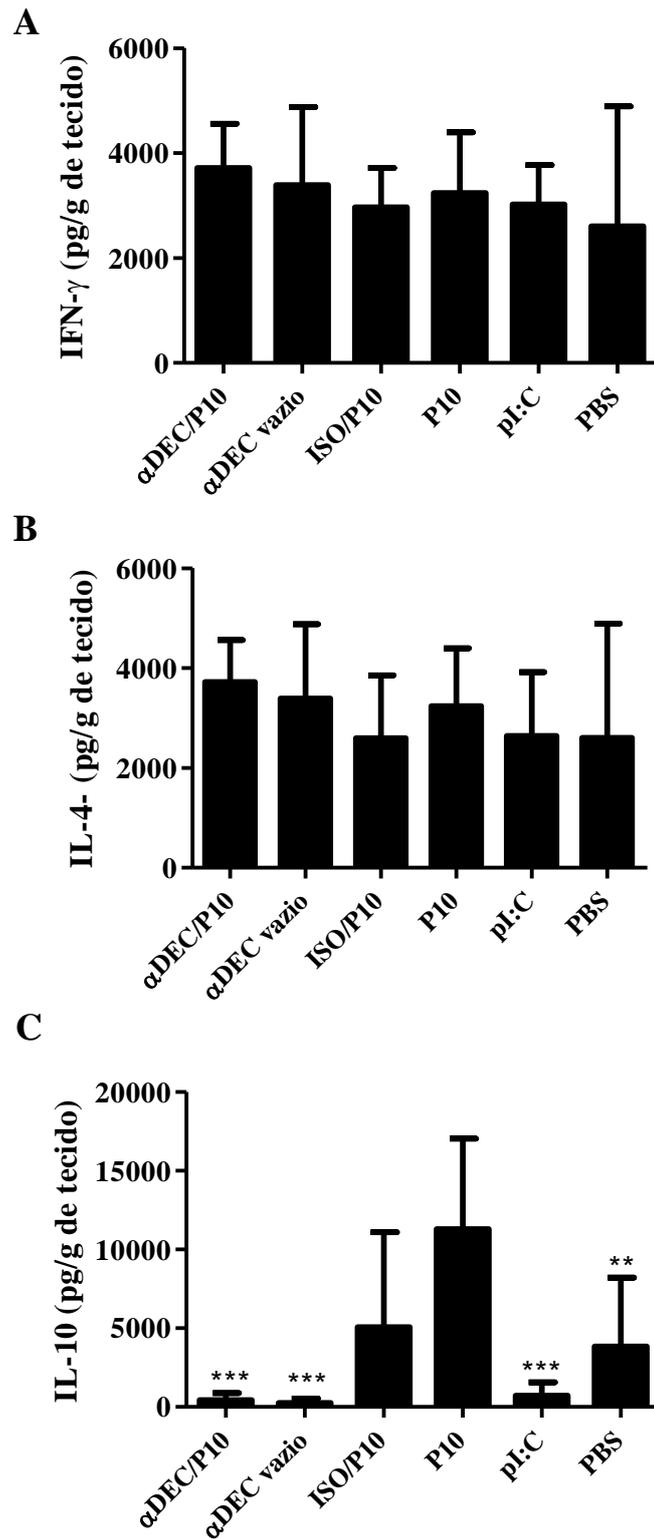
### **Produção de citocinas em órgãos de animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com anticorpos quiméricos.**

Avaliamos a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 no fígado, baço e pulmões dos camundongos 10 dias após o término do tratamento. No baço verificamos que a produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 não diferiu entre os grupos de tratamento, mas a produção de IL-10 foi menor no grupo tratado com o anticorpo quimérico  $\alpha$ DEC/P10 na presença de adjuvante, em relação

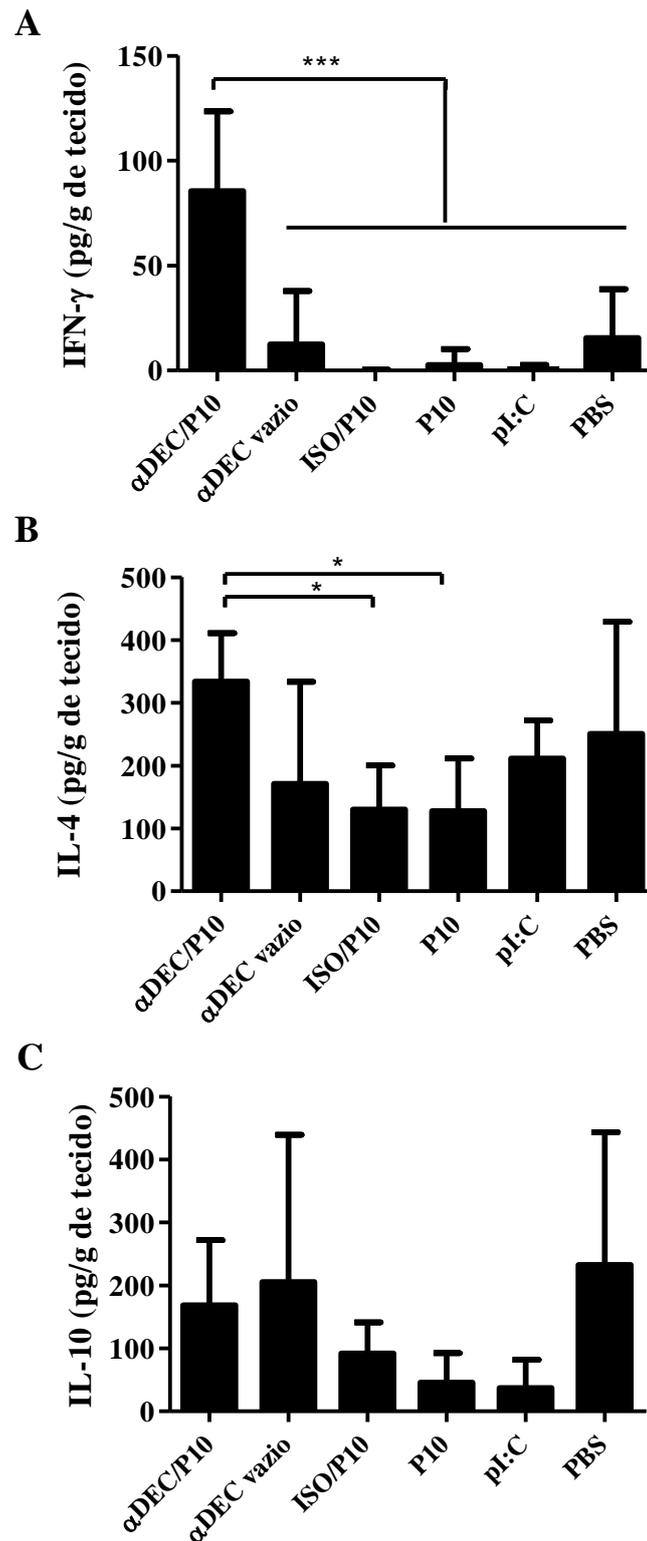
ao grupo tratado com o peptídeo P10 na presença de adjuvante, porém sem utilizar a estratégia do direcionamento através do anticorpo (Figura 28).

Já no fígado, há uma maior produção tanto de IFN- $\gamma$  quanto de IL-4 nos grupos tratados com  $\alpha$ DEC/P10 em relação aos demais (Figura 29).

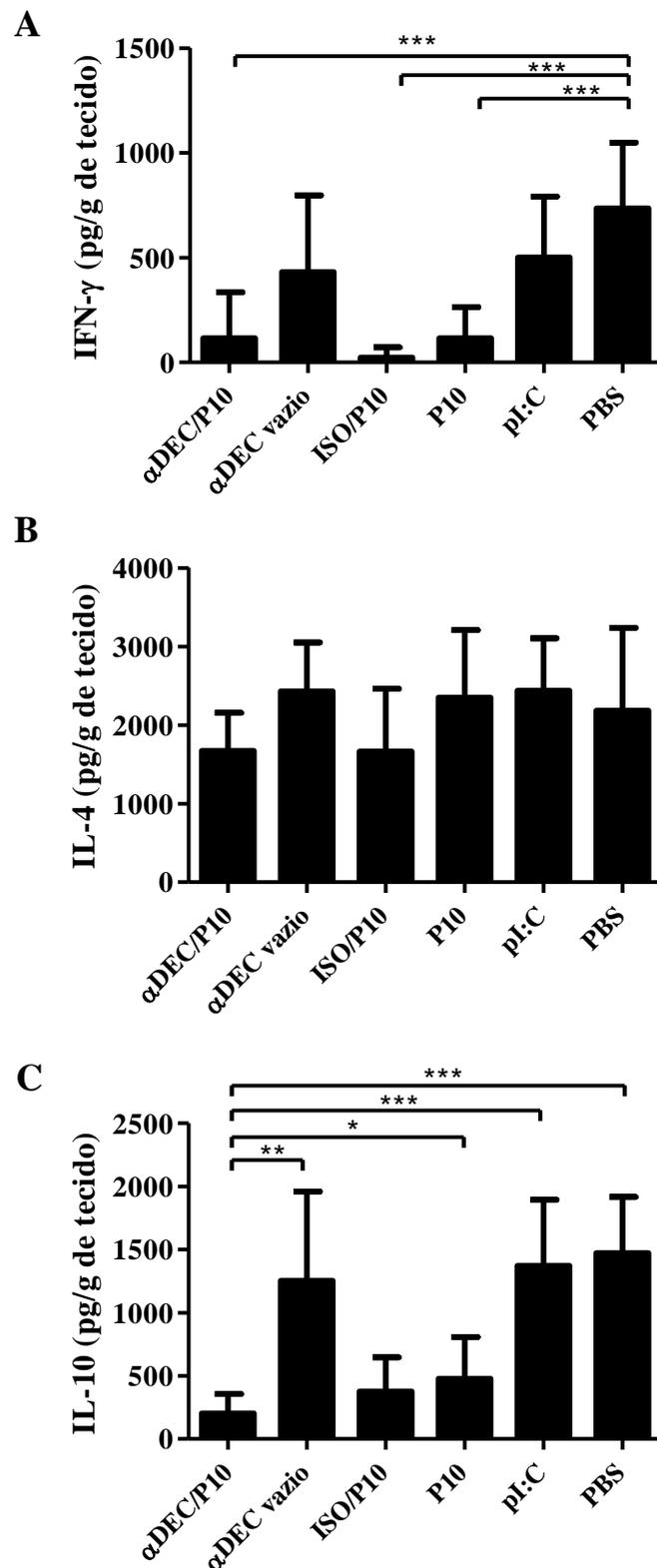
No pulmão, que é o órgão onde o fungo preferencialmente se instala, verificamos que a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 é menor nos grupos tratados com o nosso anticorpo, e, em relação a IL-4, não houve diferença entre os grupos (Figura 30).



**Figura 28.** Níveis de citocinas produzidas pelo baço de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* e tratados com anticorpos quiméricos. As citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) foram detectados em homogenatos de baço de camundongos (n=8) infectados com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com 3 doses de anticorpos quiméricos ( $\alpha$ DEC/P10,  $\alpha$ DECvazio e ISO/P10) ou o peptídeo P10 na presença de adjuvante pI:C. Os grupos controles receberam ou somente o adjuvante ou PBS. Todos os grupos foram eutanasiados 10 dias após o tratamento. A análise estatística foi realizada pelo One-Way ANOVA, e as múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$ , sendo \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ , ambos em relação ao grupo P10.



**Figura 29.** Níveis de citocinas produzidas pelo fígado de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* e tratados com anticorpos quiméricos. As citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) foram detectados em homogenatos de fígado de camundongos (n=8) infectados com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com 3 doses de anticorpos quiméricos ( $\alpha$ DEC/P10,  $\alpha$ DECvazio e ISO/P10) ou o peptídeo P10 na presença de adjuvante pI:C. Os grupos controles receberam ou somente o adjuvante ou PBS. Todos os grupos foram eutanasiados 10 dias após o tratamento. A análise estatística foi realizada pelo One-Way ANOVA, e as múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$ , sendo \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ , em relação ao grupo  $\alpha$ DEC/P10.



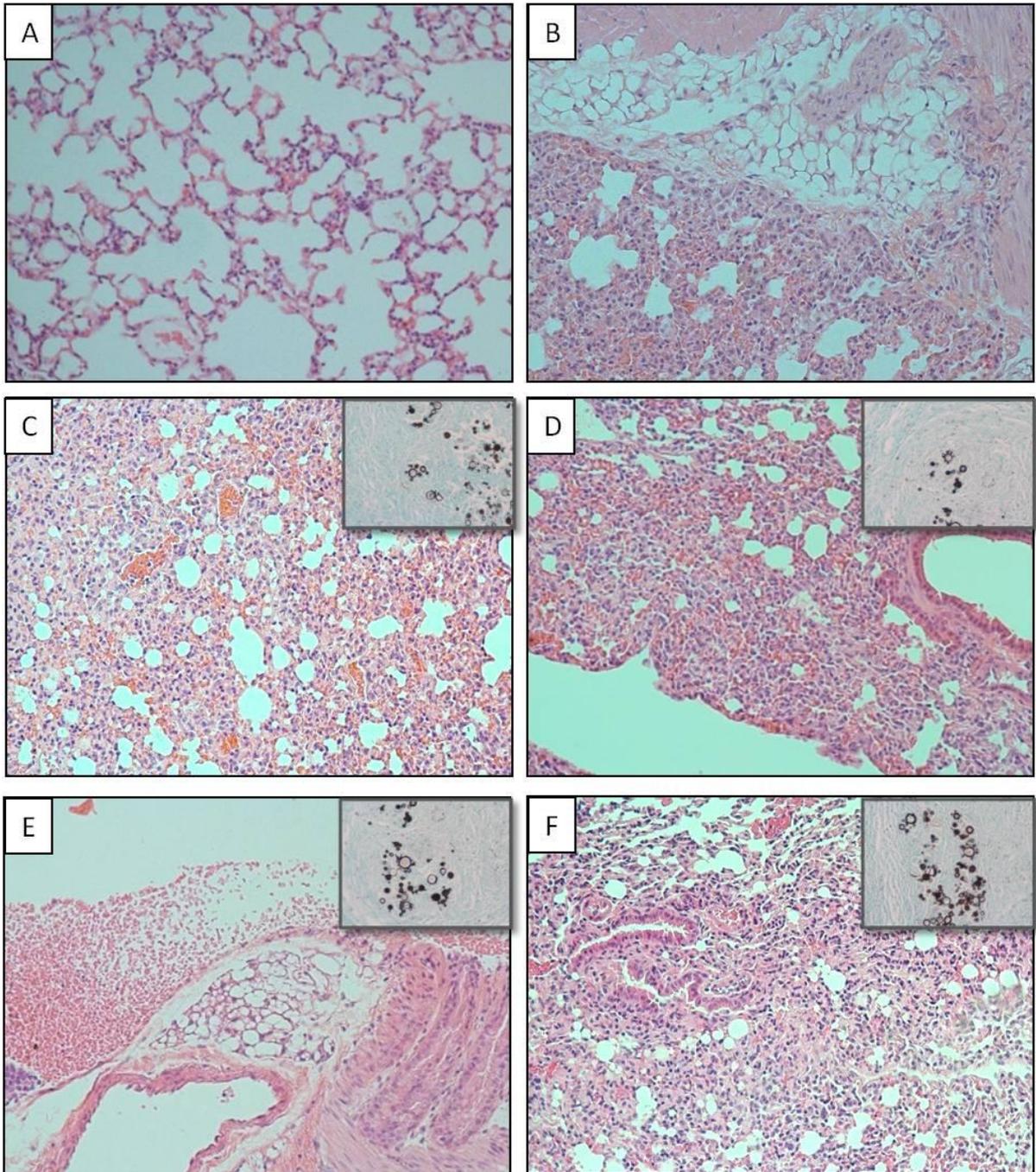
**Figura 30. Níveis de citocinas produzidas pelo pulmão de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* e tratados com anticorpos quiméricos.** As citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) foram detectados em homogenatos de pulmão de camundongos (n=8) infectados com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com 3 doses de anticorpos quiméricos ( $\alpha$ DEC/P10,  $\alpha$ DECvazio e ISO/P10) ou o peptídeo P10 na presença de adjuvante pI:C. Os grupos controles receberam ou somente o adjuvante ou PBS. Todos os grupos foram eutanasiados 10 dias após o tratamento. A análise estatística foi realizada pelo One-Way ANOVA, e as múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$ , sendo \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

### **Redução da carga fúngica em animais tratados com o anticorpo quimérico $\alpha$ DEC205/P10.**

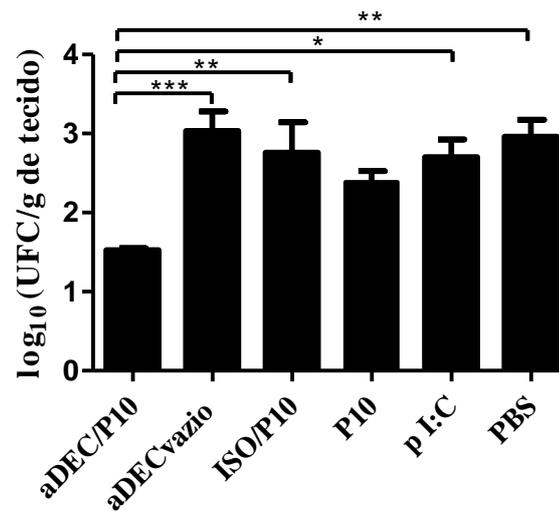
A fim de comprovar a eficácia do anticorpo quimérico realizamos a contagem de unidades formadoras de colônias após o tratamento, e também analisamos cortes histológicos dos tecidos.

Não identificamos leveduras nos cortes histológicos de fígado e baço. Nos cortes histológicos de pulmão pudemos observar que em camundongos controles, não tratados, apresentaram uma grande presença de fungos viáveis acompanhados com um intenso infiltrado inflamatório (Figura 31F). Entretanto, quando esses animais foram tratados com o anticorpo  $\alpha$ DEC205/P10 não foi mais possível encontrar fungos viáveis, observamos também uma diminuição significativa do processo inflamatório, assemelhando-se a um aspecto tecidual de animais não infectados (Figura 31A). Foi também possível observar que os outros tratamentos não foram eficazes em controlar a infecção fúngica pulmonar (Figura 31B – 31E).

Nosso principal achado foi nos ensaios de UFC, nos quais verificamos menor carga fúngica nos animais tratados com o anticorpo quimérico em comparação aos controles (Figura 32). Somados, esses resultados demonstraram a eficiência do anticorpo  $\alpha$ DEC205/P10 no controle da infecção pulmonar pelo *P. brasiliensis*.



**Figura 31. Redução do infiltrado inflamatório pulmonar em camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com  $\alpha$ DEC/P10.** Os grupos experimentais foram infectados por via i.t. com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* e, após 45 dias, foram tratados com 3 doses de anticorpos quiméricos ou seus respectivos controles, com intervalos de 7 dias entre eles. Dez dias após o tratamento os animais foram eutanasiados. Os dados representam o total de 8 animais por grupo. Histologia de secções de pulmão de camundongos BALB/c infectados e tratados:  $\alpha$ DEC/P10 (A),  $\alpha$ DECvazio (B), Isotipo controle (C), peptídeo P10 (D) todos em presença de estímulo de maturação poli I:C, somente poli I:C (E) e PBS (F). Coloração hematoxilina-eosina e Gomori (aumento foi de 200x).



**Figura 32. Redução da carga fúngica pulmonar em camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com αDEC/P10.** Os grupos experimentais foram infectados por via i.t. com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* e, após 45 dias, foram tratados com 3 doses de anticorpos quiméricos ou seus respectivos controles, com intervalos de 7 dias entre eles. Dez dias após o tratamento os animais foram eutanasiados. Os dados representam o total de 8 animais por grupo. Os números foram expressos em log UFC/g (log nas Unidades formadoras de colônias por grama de tecido pulmonar). A análise estatística foi realizada pelo One-Way ANOVA, e as múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$ , sendo \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

## ***V. Discussão e Considerações***

A importância das infecções fúngicas aumentou muito devido ao impacto que essas estão causando na atualidade. Diversas razões motivaram o interesse no desenvolvimento de vacinas contra infecções fúngicas, como o aparecimento da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), maior expectativa de vida da população e o aumento da administração de potentes drogas imunossupressoras utilizadas no combate de doenças auto-imunes, tumores e para prevenir transplantes. Além disso, existe uma crescente necessidade de investir-se em ferramentas imunológicas que possam ser usadas em associação ou até mesmo que sejam capazes de substituir a terapia utilizada atualmente. Na PCM, dados clínicos e experimentais indicam que a imunidade mediada por células desempenha papel significativo na defesa do hospedeiro contra a infecção por *P. brasiliensis*, resultando na formação de granulomas compactos, que limitam a infecção. Iniciamos o trabalho com a intenção de produzir anticorpos quiméricos, com o objetivo de direcionar a proteína gp43 de *P. brasiliensis* para DCs. Como já mostrado anteriormente para outros antígenos, o processo de direcionamento acompanhado de um estímulo de maturação para DCs, como Poly I:C e  $\alpha$ CD40, tem levado a uma resposta imune protetora em alguns modelos experimentais.

Encontramos, no entanto, alguns problemas ao trabalharmos com a gp43. O primeiro deles foi que o clone selecionado continha um intron na sequência da gp43. Para contornarmos, amplificamos separadamente as porções anterior e posterior ao intron, e depois com um PCR, unimos as duas porções. No entanto, ao começarmos a produção dos anticorpos híbridos não detectávamos os mesmos no sobrenadante da cultura celular após 7 dias (período utilizado para os outros anticorpos híbridos produzidos no laboratório de Direcionamento de Antígenos – Parasitologia ICB). Repetimos algumas vezes a transfecção transiente das células HEK 293T, fazendo pequenas alterações no protocolo, e nenhuma diferença foi vista. Dessa forma, após o período de transfecção, recolhemos o sobrenadante e lisamos as células. Em gel de SDS-PAGE e *Western Blot*, confirmamos que os anticorpos produzidos permaneciam, de alguma forma, ligados à membrana celular. Esse achado foi muito importante para entendermos a ausência de resultados. Repetimos então a transfecção em maior escala, e verificamos que após a lise, havia uma redução drástica no rendimento dos anticorpos produzidos, dificultando muito a produção dos mesmos para ensaios em animais. Antes de tentarmos otimizar o processo, decidimos verificar a viabilidade desses anticorpos purificados após lise celular, e sua capacidade de se ligar especificamente as DCs e o que vimos foi que, ao final de toda essa manipulação, o sítio de ligação deve ter se alterado, já que esses anticorpos perderam sua capacidade de se ligar ao receptor DEC205.

Por isso iniciamos experimentos para a produção de anticorpos quiméricos ligados ao P10, descrito anteriormente como um epítopo para células T CD4<sup>+</sup> (Taborda et al., 1998). Alguns trabalhos vêm mostrando a capacidade desse peptídeo em gerar uma resposta imune contra *P. brasiliensis* em diferentes preparações (adjuvante completo de Freund, flagelina FliC de *Salmonella entérica*) (Taborda et al., 1998; Braga et al., 2009). Após os testes de caracterização do anticorpo, verificamos que os anticorpos  $\alpha$ DEC/P10 eram capazes de se ligar especificamente e de forma dose-dependente ao seu receptor em DCs.

Iniciamos a imunização dos animais com 5  $\mu$ g de  $\alpha$ DEC/P10 e 50  $\mu$ g de Poly I:C e verificamos que o direcionamento foi capaz de estimular, após 10 dias, uma resposta por células T CD4<sup>+</sup> evidenciada pelo teste de ELISPOT, no qual detectamos as células produtoras de IFN- $\gamma$ . Essa resposta foi significativamente maior que em animais nos quais administramos 20  $\mu$ g de P10, também na presença de Poly I:C. É importante observar ainda que a dose utilizada de P10 foi 4 vezes maior que do anticorpo quimérico, o que resulta em uma dose em torno de 200 vezes maior de P10 administrado em relação a concentração de P10 existente em fusão com o anticorpo, evidenciando ainda mais o efeito do direcionamento na resposta ao peptídeo administrado. Entretanto, como demos uma segunda dose, os animais que receberam P10 conseguiram manter sua resposta por células produtoras de IFN- $\gamma$ , enquanto os animais que receberam o anticorpo híbrido, tiveram uma resposta próxima ao controle (animais que receberam duas doses do adjuvante Poly I:C).

Com o intuito de verificar se a resposta visualizada primeiramente era capaz de exercer proteção aos animais, fizemos o desafio com *P. brasiliensis* dos animais imunizados com duas doses e dosamos as citocinas de macerados de órgãos. Verificamos, entretanto que após 15 e 30 dias do desafio, a doença não deve ainda ter se disseminado para o fígado e baço, já que a produção de citocinas por grama de órgão, ou se manteve muito baixa, ou não apresentou diferenças entre os grupos de animais e dias de análise. Já no tecido pulmonar, verificamos uma intensa produção de citocinas, sendo que os grupos imunizados com  $\alpha$ DEC/P10 e seu controle isotípico induziram grande quantidade de IFN- $\gamma$  e IL-4 após 30 dias de desafio. A produção sustentada de IFN- $\gamma$  está relacionada à resistência a PCM (KASHINO et al., 2001), embora já tenha sido mostrado que animais susceptíveis produzem a citocina no início da infecção (CANO et al., 1995; Cano et al., 2000). A presença da citocina IL-4 pode sugerir o início de uma regulação da resposta imune ao fungo, que é um evento importante, já que grande parte dos aspectos clínicos da PCM estão relacionados a uma resposta imune exacerbada ao fungo, com destruição tecidual e posterior fibrose do tecido. A IL-4 também está relacionada a uma resposta não protetora, entretanto, uma resposta imune muito

prolongada e exacerbada é prejudicial ao organismo, já que pode levar a destruição tecidual no sítio inflamado. Arruda et al. (2004) mostram que a IL-4 pode exercer diferentes papéis na PCM pulmonar, dependendo do padrão genético do hospedeiro. Depleção de IL-4 em camundongos geneticamente susceptíveis B10. A levou ao aumento da carga fúngica pulmonar, enquanto que a depleção *in vivo* de IL-4 endógena em modelo de PCM em C57BL/6 (sensibilidade intermediária ao *P. brasiliensis*) foi menos grave, sendo associada com o aumento da produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 e com a diminuição da secreção de IL-4 e IL-5. Esses resultados são diferentes dos mostrados para outras micoses sistêmicas, como candidíases, histoplasmose e coccidioidomicoses, nos quais a depleção *in vivo* de IL-4 induz imunoproteção e uma polarização para respostas Th1 maior que Th2. Uma explicação é que a IL-4 não é o principal mediador que governa a susceptibilidade na PCM em camundongos B10.A. Os efeitos antagônicos de IL-4 em hospedeiros diferentes geneticamente demonstram que vários mecanismos imunológicos podem levar a suscetibilidade à infecção pulmonar por *P. brasiliensis* e, mais do que isso, o paradigma Th1-Th2 não explica todos os mecanismos imunológicos que determinam a evolução da doença (ARRUDA et al., 2004).

Nos ensaios de terapia, nossos resultados demonstraram boa evolução clínica durante o tratamento com o anticorpo quimérico  $\alpha$ DEC205/P10, comprovados pela diminuição da carga fúngica pulmonar, tecido histopatológico com ausência de infiltrado inflamatório e níveis de citocinas pulmonares basais. Os resultados obtidos por De Amorin et al. 2013, no qual utilizaram uma vacina de DNA (pcDNA3-P10), citocinas relacionadas ao padrão Th1 permaneceram altas durante o tratamento, além do aumento também da IL-10, e com esse perfil de citocinas, embora diferente dos encontrados no nosso trabalho, também tenham encontrado boa evolução com o tratamento. Ferreira et al., 2007, propõe que o *P. brasiliensis* induz DCs reguladoras em camundongos suscetíveis, o que promove a produção de IL-10 e contribui para a susceptibilidade de camundongos à infecção. Acredita-se nesse caso, que as células reguladoras tenham sido as responsáveis pela histopatologia normal do tecido tratado. É importante ressaltar, que no início da infecção, o padrão de Th1 é importante na resposta ao fungo, mas por tempos prolongados, a inflamação exacerbada pode danificar o tecido, e muitas vezes, essa é a causa relacionada ao agravamento da doença, com fibrose pulmonar, e perda da função do tecido. Já Rittner et al, 2012 somente demonstrou o retorno do tecido ao normal, com, após a administração de 7 doses de DNA de P10 e IL-12 ao longo de 6 meses de tratamento.

O baixo nível de citocinas pro-inflamatórias no órgão após o tratamento, o menor tempo do mesmo e apenas três doses, além de segurança e eficácia do anticorpo  $\alpha$ DEC205 em

estudos em humanos, são vantagens para a utilização do anticorpo quimérico  $\alpha$ DECP10 em relação aos estudos mais recentes utilizando o peptídeo P10. Esses resultados são promissores, e com eles surgem novos questionamentos sobre qual o mecanismo utilizado para combater a doença e quais são as células que medeiam essa resposta gerada pelo  $\alpha$ DECP10.

## ***VI. Conclusões***

---

- ✓ Foram contruídos os anticorpos quiméricos fusionados a gp43 e ao P10, no entanto somente os fusionados ao P10 foram capazes de se ligar especificamente ao receptor DEC-205.
  
- ✓ Os resultados obtidos no protocolo de vacinação com o anticorpo  $\alpha$ DEC/P10, mostraram que o pulmão, o sítio principal de infecção, apresentou elevada produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 após 30 dias do desafio em relação aos animais controle (somente poly I:C).
  
- ✓ Além disso, no protocolo de terapia com os anticorpos quiméricos, verificamos que os pulmões dos animais apresentaram níveis de citocinas basais, ausência de infiltrado inflamatório e diminuição da carga fúngica.
  
- ✓ Nossos resultados em conjunto, indicam que direcionamento do P10 através do anticorpo quimérico  $\alpha$ DEC/P10, na presença de Poly I:C, é uma estratégia promissora para o tratamento da PCM causada por *P. brasiliensis*.

## **VII. Referências Bibliográficas**

ACORCI, M.J.; DIAS-MELICIO, L.A.; GOLIM, M.A.; BORDON-GRACIANI, A.P.; PERACOLI, M.T.; SOARES, A.M. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. **Scand J Immunol**, v.69, p.73-9, 2009.

AHUJA, S.S.; REDDICK, R.L.; SATO, N.; MONTALBO, E.; KOSTECKI, V.; ZHAO, W.; DOLAN, M.J.; MELBY, P.C.; AHUJA, S.K. Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. **Journal of Immunology**, v.163, p.3890-3897, 1999.

ALMEIDA, S. M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TEIVE, H. A. et al. Central nervous system paracoccidioidomycosis: clinical features and laboratorial findings. **Journal of Infection**, v.48, p.193-198, 2004.

ALMEIDA, O.P.; JACKS, J.Jr; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: as emerging deep mycosis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.14(5), p.377-383, 2003.

ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v.5, p.125-141, 1930.

ALMEIDA, S.R.; LOPES, J.D. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.529-537, 2001.

AMARAL, A.C.; MARQUES, A.F.; MUÑOZ, J.E.; BOCCA, A.L.; SIMIONI, A.R.; TEDESCO, A.C.; MORAIS, P.C.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P.; FELIPE, M.S.S. Poly(lactic acid-glycolic acid) nanoparticles markedly improve immunological protection provided by peptide P10 against murine paracoccidioidomycosis. **British Journal of Pharmacology**, 159, 1126–1132, 2010.

ANDRÉ, D.C.; LOPES, J.D.; FRANCO, M.F.; VAZ, C.A.; CALICH, V.L. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. **Microbes Infect.** May;6(6):549-58, 2004.

ANDREOTTI, P.F.; DA SILVA, J.L.M.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M.A.; BERNARD, G.; SOARES, C.P.; MENDES-GIANNINI, M.S.J. Isolation and partial characterization of a 30kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, v.7, p.875-881, 2005.

ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; PINA, A.; KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; VAZ, C.A.; FRANCO, M.F.; KELLER, A.C.; CALICH, V.L. Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infect Immun.** Jul;72(7):3932-40, 2004.

Banco de imagens do laboratório de Micologia Médica - Micoses Sistêmicas- LEPAC –UEM. Acesso em: [http://www.dac.uem.br/micologia/micoses\\_sistemicas.php](http://www.dac.uem.br/micologia/micoses_sistemicas.php)

BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; PERRUCCIO, K.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; PITZURRA, L.; VELARDI, A.; D'OSTIANI, C.F.; CUTLER, J.E.; ROMANI, L. Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. **J Immunol.** Mar 15;168(6):2904-13, 2002.

BIAGIONI, L.; SOUZA, M.J.; CHAMMA, L.G.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; MOTA, N.G.; FRANCO, M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, n.5, p.617-621, 1984.

BLOTTA, M.H.; MAMONI, R.L.; OLIVEIRA, S.J.; NOUER, S.A.; PAPAORDANOU, P.M.; GOUVEIA, A.; CAMARGO, Z.P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, n.3, p.390-394, 1999.

BONIFAZ, L.; BONNYAY, D.; MAHNKE, K.; RIVERA, M.; NUSSENZWEIG, M.C.; STEINMAN, R.M. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8(+) T cell tolerance. **Journal of Experimental Medicine**, v.196, n.12, p.1627-1638, 2002.

BOSCARDIN, S.B.; HAFALLA, J.C.R.; MASILAMANI, R.F.; KAMPHORST, A.O.; ZEBROSKI, H.A.; RAI, U.; MORROT, A.; ZAVALA, F.; STEINMAN, R.M.; NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, M.C. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. **Journal of Experimental Medicine**, v.203, n.3, p.599-606, 2006.

BOZZA, S.; PERRUCCIO, K.; MONTAGNOLI, C.; GAZIANO, R.; BELLOCCHIO, S.; BURCHIELLI, E.; NKWANYUO, G.; PITZURRA, L.; VELARDI, A.; ROMANI, L. A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation. **Blood.** Nov 15;102(10):3807-14. Epub 2003 Jun 5, 2003.

BRAGA, C.J.M., RITTNER, G.M.G., MUÑOZ HENAO, J. E., TEIXEIRA, A.F., MASSIS, L.M., SBROGIO-ALMEIDA, M.E., TABORDA, C.P., TRAVASSOS, R., FERREIRA, L.C.S. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10

sequence and the *Salmonella enteric* FliC Flagellin. **Infection and Immunity**, p. 1700–1707, 2009.

BRUMMER, L.; CASTANEDA, F.; RESTREPO, A.A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, p.89-117, 1993.

CALCAGNO, A.M.; NIÑO-VEGA, G.; SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. **J Clin Microbiol**. Jun;36(6):1733-6, 1998.

CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.; SIQUEIRA, A.M.; BURGUER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British Journal of Experimental Pathology**, v.66, p.585-594, 1985.

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

CALICH, V.L.G.; FAZIOLI, R.A.; TEIXEIRA, H.C.; RUSSO, M.; SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; VAZ, C.A.C. Mechanisms of host-resistance to *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Congress of International Society For Human And Animal Mycology, 10, Barcelona, 1988. **Proceedings**. Barcellona, p.154-159, 1988.

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

CALICH, V.L.G.; KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.615-623, 1998.

CAMARGO, Z.P.; GESZTESI, J.L.; SARAIVA, E.C.O.; TABORDA, C.P.; VICENTINI, A.P.; LOPES, J.D. Monoclonal capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.2377-2381, 1994.

CAMPOS, E. P.; ARTORI, J. C.; HETCH, M. L.; FRANCO, F. Clinical and Serologic features of 47 patients with Paracoccidioidomycosis treated by Amphotericin B. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 26, n 4, p. 212-217 jul-ago, 1984.

CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L.M.; VAZ, C.A.C.; RUSSO, M.; CALICH, V.L.G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice, relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.** 63:1777–1783, 1995.

CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L.M.; MENGEL, J.A.; XIDIEH, C.F.; CALICH, V.L.G. Depletion of CD8<sub>+</sub> T cells in vivo impairs host defense of resistant and susceptible mice to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.** 68:352–359, 2000.

CASTAÑEDA, E.; BRUMER, E.; PERLMAN, A.M.; MCEVENS, J.; STEVENS, D.A. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency and the effect of siderophores. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.26, p.352-358, 1988.

CHEONG C.; CHOI. J.H.; VITALE, L.; HE, L.Z.; TRUMPFHELLER C.; BOZZACCO, L.; DO, Y.; NCHINDA, G.;PARK, S.H.; DANDAMUDI, D.B.; SHRESTHA, E.; PACK, M.; LEE, H.W.; KELER, T.; STEINMAN, R.M.; PARK, C.G. Improved cellular and humoral immune responses in vivo following targeting of HIV Gag to dendritic cells within human anti-human DEC205 monoclonal antibody. **Immunobiology**, v.116, p.3828-3838, 2010.

CLEMONS, K.V.; FELDMAN, D.; STEVENS, D.A. Influence of estradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of General Microbiology**, v.135, p.1607-1617, 1989)

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

DE ALMEIDA, S.M. Central nervous system paracoccidioidomycosis: an overview. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.9(2), p 126-133, 2005.

DE AMORIM, J.; MAGALHÃES, A.; MUÑOZ, J.E.; RITTNER, G.M.; NOSANCHUK, J.D.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis induces long-term protection in presence of regulatory T cells. **Microbes Infect.** 15(3):181-91, 2013.

DE MATTOS GROSSO, D.; DE ALMEIDA, S.R.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infect Immun.** Nov;71(11):6534-42, 2003.

DEL NEGRO G. Ketoconazole in paracoccidioidomycosis. A long-term therapy study with prolonged follow-up. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.24, p.27-39, 1982.

DEN HAAN, J.M.M.; LEHAR, S.M.; BEVAN, M.J. CD8 (+) but not CD8 (-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells *in vivo*. **Journal of Experimental Medicine**, v.192, n.12, p.1685-1696, 2000.

DILLON N. L.; SAMPAIO S. A.; HABERMANN A.; et al. Delayed results of treatment of paracoccidioidomycosis with amphotericin B plus sulfonamides versus amphotericin B alone. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.28, p.263-266, 1986.

DO, Y; PARK, C.G.; KANG, Y.; PARK, S.H.; LYNCH, R.M.; LEE, H.; POWELL, B.S.; STEINMAN R.M. Broad T cell immunity to the LcrV virulence protein is induced by targeted delivery to DEC-205/CD205 positive mouse dendritic cells. **Eur J Immunol**, v.38(1), p.20-29, 2008.

ELLIAS, J. Jr.; DOS SANTOS, A. C.; CARLOTTI, C. G. Jr.; et al. Central nervous system paracoccidioidomycosis: diagnosis and treatment.. **Surgical Neurology (Suppl.1)** p.S13-S21, 2005.

ESPOSITO-FARESE, M.E.; SAUTES, C.; DE LA SALLE, H.; LATOUR, S.; BIEBER, T.; DE LA SALLE, C.; OHLMANN, P.; FRIDMAN, W.T.; CAZENAVE, J.P.; TEILLAUD, J.L. Membrane and soluble Fc gamma RII/RIII modulate the antigen-presenting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens. **Journal of Immunology**, v.155, p.1725-1736, 1995.

FANGER, N.A.; WARDWELL, K.; SHEN, L.; TEDDER, T.F.; GUYRE, P.M. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. **Journal of Immunology**, v.157, p.541-548, 1996.

FELIPE, M.S.; TORRES, F.A.; MARANHÃO, A.Q.; SILVA-PEREIRA, I.; POÇAS-FONSECA, M.J.; CAMPOS, E.G.; MORAES, L.M.; ARRAES, F.B.; CARVALHO, M.J.; ANDRADE, R.V.; NICOLA, A.M.; TEIXEIRA, M.M.; JESUÍNO. R.S.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M.; BRÍGIDO, M.M. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.45(3), p369-381, 2005.

FERREIRA, K.S.; LOPES, J.D.; ALMEIDA, S.R. Regulation of T helper cell differentiation *in vivo* by gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.58, p.290-297, 2003.

FERREIRA, K.S.; BASTOS, K.R.; RUSSO, M.; ALMEIDA, S.R. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cell induces interleukin-10 production and toll-like receptor 2 expression: possible mechanisms of susceptibility. **Journal of Infectious Diseases**, v.196, p.1108-1115, 2007.

FIGDOR, C.G.; VAN KOOYK, Y.; ADEMA, G.J. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. **Nature Reviews Immunology**, v.2, n.2, p.77-84, 2002.

FÖSTER, R.; DAVALOS-MISSLITZ, A.C.; ROT, A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. **Nature Reviews Immunology**, v.8, p.362-371, 2008.

FRANCO, M.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BIACCHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, M.; MONTENEGRO, M.R. Paracoccidioidomycosis. **Baillière's Clin Trop Med Commun Dis** 4:185-220, 1989.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.25, p.5-18, 1986

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.25, p.5-18, 1986.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.20, p.129-132, 1987.

GEISSMANN, F.; LAUNAY, P.; PASQUIER, B.; LEPELLETIER, Y.; LEBORGNE, M.; LEHUEN, A.; BROUSSE, N.; MONTEIRO, R.C. A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon crosslinking by IgA complexes. **Journal of Immunology** v.166, p.346-352, 2001.

GIRALDO, R.; RESTREPO, A.; GUTIERREZ, F.; ROBLEDO, M.; LONDONO, F.; HERNANDEZ, H.; SIERRA, F.; CALLE, G. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. **Mycopathologia**, v.58, p.63-70, 1976.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITCOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENAS, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v.20, p.621-667, 2002.

GUO, M.; GONG, S.C.; MARIC, S.; MISULOVIN, Z.; PACK, M.; MAHNKE, K.; NUSSENZWEIG, M.C.; STEINMAN, R.M. A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. **Human Immunology**, v.61, n.8, p.729-738, 2000.

HAWIGER, D.; INABA, K.; DORSETT, Y.; GUO, M.; MAHNKE, K.; RIVERA, M.; RAVETCH, J.V.; STEINMAN, R.M.; NUSSENZWEIG, M.C. Dendritic cells induce

peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*. **Journal of Experimental Medicine**, v.194, n.6, p.769-779, 2001.

JACOBS, B.; WUTTKE, M.; PAPEWALIS, C.; SEISSLER, J.; SCHOTT, M.; Dendritic Cell Subtypes and *In Vitro* Generation of Dendritic Cells. **Horm Metab Res** ; 40: 99 – 107, 2008.

JIANG, W.; SWIGGARD, W.J.; HEUFLER, C.; PENG, M.; MIRZA, A.; STEINMAN, R.M.; NUSSENZWEIG, M.C. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cell is involved in antigens processing. **Nature**, v.375, n.6527, p.151-155, 1995.

JORDAN, M.; SCHALLHORN, A.; WURM, F.M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. **Nucleic Acids Res.** Feb 15;24(4):596-601, 1996.

KASHINO, S.S.; CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.; ABRAHAMSOHM, P.A.; BURGER, E. Growth curves, morphology and ultrastructure of the *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia**, v.99, p.119-128, 1987.

KENETSUNA, F.; CARBONELL, L.M.; AZUMA, I.; YAMAMURA, Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v.110, n.1, p.208-218, 1972.

LACAZ, C.S.; PASSOS FILHO, M.C.R.; FAVA NETTO, C.; MACARRON, R. Contribuição para o estudo da blastomicose-infecção: inquérito com paracoccidioidina: estudo sorológico e clínico radiológico dos paracoccidioidino-positivos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.1, p.245-259, 1959.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica**: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8. ed. São Paulo: Sarvier, 695p, 1991.

LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G., eds. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, p.1-11, 1994.

LEVITZ, S.M. Overview of host defenses in fungal infections. **Clin Infect Dis.** v.1:S37-42, 1992.

LINEHAN, S.A.; MARTINEZ-POMARES, L.; STAHL, P.D.; GORDON, S. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: *in situ* expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular

microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.189, n.12, p.1961-1972, 1999.

LOOSE, D.S.; STOVER, E.P.; RESTREPO, A.; STEVANS, D.A.; FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor like cytosol protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.80, p.7659-7663, 1983.

LOURES, F.V; PINA, A.; FELONATO, M.; CALICH, V.L.G. TLR2 Is a Negative Regulator of Th17 Cells and Tissue Pathology in a Pulmonary Model of Fungal Infection. **The Journal of Immunology**, v.183, p.1279 –1290, 2009.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. **Brasil-Médico**, v.22, p.121-124, 1908.

MAETERNS, J. A. History of development of azole derivatives. **Clinical Microbiology and Infection**, (Suppl. 1), p.1-10, 2004.

MAHNKE, K.; GUO, M.; LEE, S.; SEPULVEDA, H. SWAIN, S.L. NUSSENZWEIG, M.; STEINMAN, R.M. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. **Journal of Cell Biology** v.151, n.3, p.673-683, 2000.

MARQUES, F.; DA SILVA, M. B.; JULIANO, M. A. P.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Peptide Immunization as an Adjuvant to Chemotherapy in Mice Challenged Intratracheally with Virulent Yeast Cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** p. 2814–2819, 2006.

MARQUES, A.F.; DA SILVA, M.B.; JULIANO, M.A.; MUNHÕZ, J.E.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.** Oct;10(12-13):1251-8, 2008.

MARQUES, S.A. Paracoccidioidomicose. **An Bras Dermatol**, v.73(5), p.455-469, 1998.

MARQUES, S.A. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. **An Bras Dermatol**, v.78(2), p.135-150, 2003.

MATUTE, D.R.; SEPULVEDA, V.E.; QUESADA, L.M.; GOLDMAN, G.H.; TAYLOR, J.W.; RESTREPO, A.; McEwen, J.G. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol.** Jun;44(6):2153-7, 2006.

McEWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PATINO, M.M.; SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, 25, n.3, p.165-175, 1987.

MENDES-GIANNINI, M.J.; ANDREOTTI, P.F.; VINCENZI, L.R.; DA SILVA, J.L.; LENZI, H.L.; BENARD, G.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.; DE MATOS GUEDES, H.L.; SOARES, C.P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.** v.8(6), p.1550-9, 2006.

MOLL, H.; BERBERICH, C. Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniosis. **Immunobiology**, v.204, n.5, p.659-666, 2001.

MORAIS, F.V.; BARROS, T.F.; FUKADA, M.K.; CISALPINO, P.S.; PUCCIA, R. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol.** v.38(11), p.3960-6, 2000.

NEGRONI, R.; RUBSTEINS, P.; HERMANN, A.; et al. Results of miconazole therapy in twenty-eight patients with paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v.76, p.24-28, 1977.

NICODEMUS, C.F.; BEREK, J.S. TLR3 agonists as immunotherapeutic agents. **Immunotherapy**. 2010 Mar;2(2):137-40. doi: 10.2217/imt.10.8.

PERACOLI, M.T.; FORTES, M.R.; DA SILVA, M.F.; MONTENEGRO, M.R. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.37, p.129-136, 1995.

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

FLAVIA POPI, A.F.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell Immunol.** 2002 Jul-Aug;218(1-2):87-94.

PRADO, M.; SILVA, M.B; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in

Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103 (3), p.513-521, 2009.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.1610-1615, 1991.

RAMOS e SILVA, M. Facial and oral aspects of some venereal and tropical disease. **Acta Dermatovenereol Croat**, v.12(3), p.173-180, 2004.

RESTREPO, A.; MONCADA, L.H. Characterization of the precipitin bands detected in immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. **Applied Microbiology**, v.28, p.138-144, 1974.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E.; STOVER, E.P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D.A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v.26, p.346-345, 1984.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Saboraudia**, v.23, p.323-324, 1985.

RESTREPO, A.; MONCADA, L.H. Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel tests for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Applied Microbiology**, v.28, p.132-137, 1972.

RITTNER GM, MUÑOZ JE, MARQUES AF, NOSANCHUK JD, TABORDA CP, TRAVASSOS LR. Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis. **PLoS Negl Trop Dis**. 6(2):e1519, 2012.

RIVITTI, E.A., AOKI, V. Deep fungal infections in tropical countries. **Clin Dermatol**, v.17, p.171-190, 1999.

RODRIGUES, D.R.; DIAS-MELICIO, L.A.; CALVI, S.A.; PERACOLI, M.T.; SOARES, A.M. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxugen metabolites, **Med Mycol**, v.45, p. 27-33, 2007.

SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A.; SETEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium to yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, v.56, p.711-713, 1988.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycolo**, v.40(3), p.225-242, 2002.

SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.74(12), p.5463-7, 1977.

SHER, A.; COFFMAN, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Annual Review of Immunology**, v.10, p.385-398, 1992.

SHIKANAI-YASUDA, M.A., TELLES FILHO, F.Q., MENDES, R.P. et al. Consenso em Paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39(3), p. 197-310, 2006.

SHORTMAN, K.; LIU, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nature Reviews Immunology**, v.2 (3), p.151-161, 2002.

SHORTMAN, K.; NAIK, S.H. Steady-state and inflammatory dendritic cell development. **Nature Reviews Immunology**, v.7 (1), p.19-30, 2007

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; LEITE MAFFEI, C.M. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v.36, p.37-42, 1998.

SPLENDORE, A. A Zymonematozi com localizzazione nella cavità della bocca, osservata in Brasile. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de Sés Filiales**, v.5, p.313-319, 1912.

STEINMAN, R.M.; COHN, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs in mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **Journal of Experimental Medicine**, v.137, n.5, p.1142-1162, 1973.

STRAUS, A.H.; FREYMÜLLER, E.; TRAVASSOS, L.R.; TAKAHASHI, H.K. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. **J Med Vet Mycol**. v.34(3), p.181-6, 1996.

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. **Infect Immun**. v.66(2), p.786-93, 1998.

TAVIAN, E.G.; DIAS-MELICIO, L.A.; GOLIM, M.A.; BORDON-GRACIANI, A.P.; PERACOLI, M.T.; SOARES, A.M. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. **Citokine**, v.41, p. 48-53, 2008.

TEIXEIRA ,M.M.; THEODORO, R.C.; DE CARVALHO, M.J.; FERNANDES, L., PAES, H.C.; HAHN, R.C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M.S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol.** Aug;52(2):273-83. 2009

TRUMPFHELLER, C.; FINKE, J.S.; LOPEZ, C.B.; MORAN, T.M.; MOLTEDO, B.; SOARES, H.; HUANG, Y.X.; SCHLESINGER, S.J.; PARK, C.G.; NUSSENZWEIG, M.C.; GRANELLI-PIPERNO, A.; STEINMAN, R.M. Intensified and protective CD4(+) T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. **Journal of Experimental Medicine**, v.203, n.3, p.607-617, 2006.

UNANUE, E.R.; ALLEN, P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. **Science**, v.236, p.551-557, 1987.

VAN TVELT, L.; ANDRIEU, M.; VERHASSELT, V.; CONNAN, F.; CHOPPIN, J.; VERCRUYSSSE, V.; GOLDMAN, M.; HOSMALIN, A.; VRAY, B. *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8+ T lymphocytes. **International Immunology**, v.14, n.10, p.1135-1144, 2002.

VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; FRANCO, M.F.; DE SOUZA, W.; DE MORAES, J.Z.; TRAVASSOS, L.R.; LOPES, J.D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect Immun.** Apr;62(4):1465-9, 1994.

WICK, J.M. The role of dendritic cells in the immune response to Salmonella. **Immunology Letters**, v.85, p.99-102, 2003.

WILLMENT, J.A.; BROWN, G.D. C-type lectin receptors in antifungal immunity. **Trends in Microbiology**, v.16, p.27-32, 2007.

YARZÁBAL, L.A.; BOUT, D.; NAQUIRA, F.; FRUIT, J.; ANDRIEUS, S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. **Sabouraudia**, v.15, p.79-85, 1977.

***VIII. Anexos***

---

**Parecer da Comissão de Ética no Uso Animais****UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA**

Ofício CEUA/FCF/36/2011

**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **“Direcionamento de gp43 recombinante para células dendríticas ‘in vivo’: uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacina na Paracoccidioidomicose”** (Protocolo CEUA/FCF/292), de responsabilidade da pesquisadora **Suelen Silvana dos Santos** sob a orientação do Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi **APROVADO** em reunião de 04 de abril de 2011.

São Paulo, 07 de abril de 2011.

**Prof. Dr. Marco Antonio Stephano**  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/FCF/USP



## **Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: [pgfarma@usp.br](mailto:pgfarma@usp.br), (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Documento sem validade oficial**

**FICHA DO ALUNO**

**9136 - 6344144/2 - Suelen Silvana dos Santos**

**Email:** suelenss@usp.br  
**Data de Nascimento:** 06/09/1985  
**Cédula de Identidade:** RG - 9.158.829-3 - PR  
**Local de Nascimento:** Estado do Paraná  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Farmacêutico - Universidade Estadual de Maringá - Paraná - Brasil - 2008  
**Mestrado:** Mestre em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2010

**Curso:** Doutorado  
**Programa:** Farmácia (Análises Clínicas)  
**Área:** Análises Clínicas  
**Data de Matrícula:** 30/08/2010  
**Início da Contagem de Prazo:** 30/08/2010  
**Data Limite para o Depósito:** 29/12/2014  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Sandro Rogerio de Almeida - 30/08/2010 até o presente.  
 E.Mail: sandroal@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 30/08/2010  
**Prorrogação:** 120 dias  
 Período de 30/08/2014 a 28/12/2014  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 13/09/2012  
**Data do Depósito do Trabalho:** 29/08/2014  
**Título do Trabalho:** ". "  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:** 29/10/2014  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**  
**Histórico de Ocorrências:** Ingressou no Doutorado em 30/08/2010  
 Prorrogação em 29/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)

**Última ocorrência:** Prorrogação em 29/07/2014

**Impresso em:** 06/10/14 17:09:08



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**

**FICHA DO ALUNO**

**9136 - 6344144/2 - Suelen Silvana dos Santos**

<b>Sigla</b>	<b>Nome da Disciplina</b>	<b>Início</b>	<b>Término</b>	<b>Carga Horária</b>	<b>Cred.</b>	<b>Freq.</b>	<b>Conc.</b>	<b>Exc.</b>	<b>Situação</b>
FBC5727-2/1	Tópicos Avançados da Imunidade Inata Induzida por Fungos Patogênicos	27/10/2010	30/11/2010	60	4	88,8	B	N	Concluída
BIO5788-2/3	Inglês em Ciência (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	14/03/2011	26/06/2011	120	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
BMM5777-2/3	Culturas Celulares e suas Aplicações em Microbiologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/04/2011	08/05/2011	90	6	100	A	N	Concluída
MIP5735-1/2	Infecções Fúngicas em Imunodeprimidos (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	09/05/2011	12/06/2011	90	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5803-1/4	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	09/08/2011	22/08/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5710-6/1	Antígenos Recombinantes: Aplicação em Diagnóstico e Desenvolvimento de Vacinas	07/11/2011	27/11/2011	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5748-3/3	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	24/04/2012	05/06/2012	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
BMM5895-1/1	Micoses Sistêmicas Emergentes e Re-Emergentes: Análise Crítica com Ênfase no	07/05/2012	03/06/2012	60	4	80	A	N	Concluída

	Diagnóstico Laboratorial (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)									
FBC5748- 4/1	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação (1)	08/04/2014	19/05/2014	60	4	91	A	N	Concluída	

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
<b>Disciplinas:</b>	0	20	24
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	20	24

**Créditos Atribuídos à Tese:** 167

**Observações:**

1) Disciplina(s) cursada(s) voluntariamente pelo(a) candidato(a) após ter cumprido as exigências regulamentares.

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

**Última ocorrência:** Prorrogação em 29/07/2014

**Impresso em:** 06/10/14 17:09:08



## Suelen Silvana dos Santos

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5239001962471650>

Última atualização do currículo em 06/10/2014

Possui graduação em Farmácia com habilitação em Análises Clínicas pela Universidade Estadual de Maringá (2007), especialização em Farmacologia para Profissionais da Saúde pelo Centro Universitário de Maringá (2010) e mestrado em Análises Clínicas na Universidade de São Paulo (2010). Atualmente realiza doutorado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, e como pesquisadora se aprofundou em técnicas de biologia molecular e citometria de fluxo, se dedicando ao estudo da Imunologia das Micoses. **(Texto informado pelo autor)**

### Identificação

<b>Nome</b>	Suelen Silvana dos Santos
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	SANTOS, Suelen Silvana dos; Santos, Suelen S.; Silvana dos Santos, Suelen

### Endereço

<b>Endereço Profissional</b>	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Av. Lineu Prestes, 580 Cidade Universitária 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (44) 30913633 Fax: (44) 32631387 URL da Homepage: <a href="http://www.fcf.usp.br">http://www.fcf.usp.br</a>
------------------------------	---

### Formação acadêmica/titulação

<b>2010</b>	Doutorado em andamento em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. com <b>período sanduíche</b> em Albert Einstein College of Medicine (Orientador: Joshua D. Nosanchuk). Título: Direcionamento de gp43 recombinante para células dendríticas in vivo: uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacina na Paracoccidiodomicose, Orientador:  Sandro Rogério de Almeida.
<b>2008 - 2010</b>	Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Análise da capacidade migratória e da ativação de linfócitos T CD4+ por células dendríticas na paracoccidiodomicose experimental, Ano de Obtenção: 2010. Orientador:  Sandro Rogério de Almeida. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
<b>2008 - 2010</b>	Especialização em Farmacologia para Profissionais da Saúde. (Carga Horária: 380h). Centro de Ensino Superior de Maringá, CESUMAR, Brasil. Título: Terapia na Paracoccidiodomicose. Orientador: Ciomar Aparecida Bersani Amado.
<b>2003 - 2007</b>	Graduação em Farmácia com Habilitação em Análises Clínicas. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.

## Formação Complementar

---

<b>2009 - 2009</b>	Citometria de Fluxo-FACSCanto II. (Carga horária: 21h). Becton, Dickinson and Company.
<b>2009 - 2009</b>	Novas tecnologias em vacinas recombinantes. (Carga horária: 30h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
<b>2009 - 2009</b>	"Fórum de Ética em Experimentação Animal FCF-USP". (Carga horária: 7h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
<b>2006 - 2006</b>	Terapia fotodinâmica. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
<b>2006 - 2006</b>	Bioprocessos para a produção de vacinas de DNA. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
<b>2006 - 2006</b>	O Farmacêutico frente a surtos epidemiológicos. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
<b>2006 - 2006</b>	Boas práticas em Farmácia. (Carga horária: 8h). Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
<b>2005 - 2005</b>	Doenças emergentes: do que estamos falando?. (Carga horária: 3h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
<b>2005 - 2005</b>	Cosmetologia: passado, presente e futuro.. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
<b>2004 - 2004</b>	Diagnóstico Laboratorial de Micoses Humanas. (Carga horária: 8h). Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
<b>2003 - 2003</b>	Exames de Urgência - Poin of Care Testing. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
<b>2003 - 2003</b>	Vigilância epidemiológica em Saúde Pública. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.

## Atuação Profissional

---

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

### Vínculo institucional

**2010 - Atual** Vínculo: Bolsista Fapesp, Enquadramento Funcional: Aluno de Pós-graduação - Doutorado, Regime: Dedicção exclusiva.

### Vínculo institucional

**2008 - 2010** Vínculo: Bolsista Fapesp, Enquadramento Funcional: Aluno de Pós-graduação - Mestrado, Regime: Dedicção exclusiva.

### Atividades

<b>08/2012 - 08/2012</b>	Ensino, Farmácia (Análises Clínicas), Nível: Pós-Graduação Disciplinas ministradas Aplicações da Citometria de Fluxo em modelos experimentais
<b>12/2011 - 08/2012</b>	Conselhos, Comissões e Consultoria, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Cargo ou função Comissão Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas.
<b>08/2011 - 12/2011</b>	Estágios , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, . Estágio realizado Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE - Estágio em Docência junto à disciplina de graduação FBC0415- "Fisiopatologia I".
<b>04/2010 - 04/2010</b>	Ensino, Farmácia (Análises Clínicas), Nível: Pós-Graduação Disciplinas ministradas Aplicações da Citometria de Fluxo em modelos experimentais
<b>02/2009 - 07/2009</b>	Estágios , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, . Estágio realizado Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE - Estágio em Docência junto à

disciplina de graduação FBC0517 - "Diagnóstico Laboratorial das Doenças Infecciosas e Parasitárias".

#### Centro de Ensino Superior de Maringá, CESUMAR, Brasil.

##### Vínculo institucional

**2007 - 2010**

Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Aluno de Especialização

##### Atividades

**01/2007 - Atual**

Outras atividades técnico-científicas , Farmácia, .

Atividade realizada

Especialização em Farmacologia para profissionais da Saúde.

#### Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.

##### Vínculo institucional

**2003 - 2007**

Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: .

##### Atividades

**06/2006 - 06/2007**

Pesquisa e desenvolvimento , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas.

Linhas de pesquisa

Capacidade de adesão de leveduras identificadas como *Candida glabrata* e caracterização de superfícies inertes

**07/2003 - 12/2006**

Pesquisa e desenvolvimento , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas.

Linhas de pesquisa

Qualidade microbiológica de vegetais prontos para o consumo

**06/2005 - 06/2006**

Pesquisa e desenvolvimento , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas.

Linhas de pesquisa

Estudo da aderência de fungos isolados de alimentos sobre superfícies utilizadas em cozinhas

**02/2005 - 12/2005**

Extensão universitária , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Enfermagem.

Atividade de extensão realizada

"Promovendo a vida na Vila Esperança" com duração de 99horas/aula.

**08/2005 - 08/2005**

Estágios , Centro de Ciências da Saúde, .

Estágio realizado

Atuação como monitora no Evento de extensão "II Maratona de Revezamento Volta de Maringá. Pare de fumar correndo".

**06/2003 - 10/2003**

Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas.

Estágio realizado

"Práticas Laboratoriais em Micologia Médica" com duração de 144 horas.

## Linhas de pesquisa

1. Estudo da aderência de fungos isolados de alimentos sobre superfícies utilizadas em cozinhas
2. Qualidade microbiológica de vegetais prontos para o consumo
3. Capacidade de adesão de leveduras identificadas como *Candida glabrata* e caracterização de superfícies inertes

## Projetos de pesquisa

**2010 - Atual**

Direcionamento de gp43 recombinante para células dendríticas in vivo: uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacina na paracoccidiodiomicose.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Doutorado: (1) .

Integrantes: Suelen Silvana dos Santos - Coordenador / Karen Spadari Ferreira - Integrante / Sandro Rogério de Almeida - Integrante / Carlos Pelleschi Taborda -

<b>2008 - 2010</b>	<p>Integrante / Sílvia Beatriz Boscardin - Integrante.</p> <p>Análise da capacidade migratória e da ativação de linfócitos T CD4+ por células dendríticas na paracoccidiodomicose experimental</p> <p>Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p>
<b>2006 - 2007</b>	<p>Integrantes: Suelen Silvana dos Santos - Coordenador.</p> <p>Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Bolsa.</p> <p>Número de produções C, T &amp; A: 1</p> <p>Capacidade de adesão de leveduras identificadas como Candida glabrata e caracterização de superfícies inertes</p> <p>Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p> <p>Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) / Doutorado: (1) .</p>
<b>2005 - 2006</b>	<p>Integrantes: Suelen Silvana dos Santos - Coordenador.</p> <p>Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.</p> <p>Estudo da aderência de fungos isolados de alimentos sobre superfícies utilizadas em cozinhas</p> <p>Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p> <p>Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) Doutorado: (1) .</p>
<b>2003 - 2006</b>	<p>Integrantes: Suelen Silvana dos Santos - Coordenador.</p> <p>Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.</p> <p>Qualidade microbiológica de vegetais prontos para o consumo</p> <p>Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p> <p>Integrantes: Suelen Silvana dos Santos - Coordenador.</p>

## Revisor de periódico

<b>2014 - Atual</b>	Periódico: Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde
---------------------	--

## Áreas de atuação

<b>1.</b>	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Imunologia das Micoses.
<b>2.</b>	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Microbiologia/Especialidade: Micologia médica.
<b>3.</b>	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: IMUNOLOGIA/Especialidade: Imunologia Básica.
<b>4.</b>	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Microbiologia/Especialidade: Microbiologia de Alimentos.

## Idiomas

<b>Inglês</b>	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
---------------	--

## Prêmios e títulos

<b>2013</b>	Best poster prize, 1st International Meeting on Sporothrix and Sporotrichosis.
<b>2012</b>	Poster Award (ISHAM 2012) - Basic Mycology., International Society of Human and Animal Mycology.

## Produções

## Produção bibliográfica

## Citações

Web of Science	R
Total de trabalhos: 2 Total de citações: 3	Fator H: 1
Santos, Suelen S Data: 25/04/2014	

## Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

1. ★ Ferreira, Karen S. ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; Maranhão, Andrea Q. ; Garcia, Maria C. C. ; Brígido, Marcelo M. ; Lopes, José D. ; Almeida, Sandro R. . Dendritic Cells Transfected with scFv from Mab 7.B12 Mimicking Original Antigen gp43 Induces Protection against Experimental Paracoccidiodomycosis. Plos One **JCR**, v. 6, p. e15935, 2011.

Citações: **WEB OF SCIENCE**™ 1 | **SCOPUS** 1

2. ★ **Silvana dos Santos, Suelen** ; Ferreira, Karen Spadari ; Almeida, Sandro Rogerio . Paracoccidoides brasiliensis-Induced Migration of Dendritic Cells and Subsequent T-Cell Activation in the Lung-Draining Lymph Nodes. Plos One **JCR**, v. 6, p. e19690, 2011.

Citações: **WEB OF SCIENCE**™ 2 | **SCOPUS** 3

3. ★ CALSINI, Taís R S ; SVIDZINSKI, Terezinha I E ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; MIKCHA, Jane M G . Fungos em alimentos de origem vegetal / Fungi in foods of plant origin. Higiene Alimentar, v. 22, p. 40-43, 2008.

Citações: **SCOPUS** 1

## Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; CAMACHO, Daiane P ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Influência da clorexidina sobre a hidrofobicidade e aderência em cateter urinário de Candida glabrata. In: XVI Encontro Anual de Iniciação Científica, 2007, Maringá. XVI Encontro Anual de Iniciação Científica, 2007.

2. **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; CALSINI, Taís R S ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Estudo da aderência de Cladosporium cladosporioides e Candida glabrata isolados de alimentos sobre superfícies utilizadas em cozinha. In: XV Encontro anual de Iniciação Científica e VI encontro de pesquisa da UEPG, 2006, Ponta Grossa. XV Encontro Anual de iniciação Científica, 2006.

3. **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; SVIDZINSKI, Arthur e ; VANDRESEN, Daniela S ; SHINOBU, C. S. ; NEGRI, M. F. N. ; CAMPANHA, A. M. ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Infecções de pele e unha causadas por Prototheca sp. In: I Congresso de Farmácia de Maringá, 2006, Maringá. Arquivos do Mudi, 2006. v. 11.

4. SVIDZINSKI, Arthur e ; CAMPANHA, A. M. ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; MALUF, M. F. ; NEGRI, M. F. N. ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Micose Superficial Causada por Microsporum Canis: Análise de Dois Casos. In: I Congresso Internacional de Saúde, V Seminário Científico do CCS e XVIII Semana de Integração de Farmácia, 2005, Maringá. I Congresso Internacional de Saúde, V Seminário Científico do CCS e XVIII Semana de Integração de Farmácia, 2005.

## Resumos publicados em anais de congressos

1. ★ **Santos, Suelen S.** ; RAMPAZO, E. ; FERREIRA, K. S. ; TABORDA, C. P. ; BOSCARDIN, S. B. ; ALMEIDA, S. R. . Targeting the P10 peptide to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor in vivo: A new vaccine strategy against Paracoccidiodomycosis. In: ISHAM 2012, 2012, Berlin. Mycoses - Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases. Berlin: Wiley-Blackwell Verlag, 2012. v. 55.

2. FERREIRA, K. S. ; BRIGIDO, M. M. ; GHOSN, E. E. B. ; MARANHAO, A. Q. ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; ALMEIDA, S. R. . Immunization with pMAC/PS-scFv plasmid recruit dendritic cells into lymph nodes. In: Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2009, Banff. Pattern Recognition Molecules and Immune Sensors of Pathogens, 2009.
3. ★ **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; GHOSN, E. E. B. ; FERREIRA, K. S. ; ALMEIDA, S. R. . Characterization of dendritic cells from bronchoalveolar lavage after experimental infection with *Paracoccidioides brasiliensis*. In: The 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 2009, Tokyo. Medical Mycology in the 21st century: Scientific Base and Anticipated Challenges, 2009.
4. **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; GHOSN, E. E. B. ; FERREIRA, K. S. ; ALMEIDA, S. R. . Characterization of dendritic cells from bronchoalveolar lavage after experimental infection with *Paracoccidioides brasiliensis*. In: XIV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA/ XLIV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica/ Simpósio Anual de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas, 2009, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. p. 48.
5. NOAL, V. R. ; SOUSA, M. G. T. ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; GHOSN, E. E. B. ; FERREIRA, K. S. ; ALMEIDA, S. R. . Ativation of lymphocytes TCD4+ by lymphocytes B-1. In: XIV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA/ XLIV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica/ Simpósio Anual de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas, 2009, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009.
6. **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; FERREIRA, K. S. ; ALMEIDA, S. R. . Análise da capacidade migratória decélulas dendríticas na *Paracoccidioidomicose* experimental. In: 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2009, Porto de Galinhas. 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2009.
7. NOAL, V. R. ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; ALMEIDA, S. R. . Capacidade de migração de linfócitos B-1após infecção intraperitoneal com leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*. In: 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2009, Porto de Galinhas. Microbiologia in foco, 2009.
8. FERREIRA, K. S. ; BRIGIDO, M. M. ; MARANHAO, A. Q. ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; ALMEIDA, S. R. . Imunização com o plasmídeo pMAC/PS contendo o fragmento scFv obtido a partir do mab anti-idiotípico AB2-beta, mimetiza o antígeno gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* recruta células dendríticas nos linfonodos. In: 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2009, Porto de Galinhas. Microbiologia in foco.
9. **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; CALSINI, Taís R S ; PATUSSI, E. V. ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Estudo de aderência de *Cladosporium* sp isolado de alimentos sobre superfícies utilizadas em cozinha. In: 2º Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel e 2º Simpósio em Ciência e tecnologia de Aliemntos do Mercosul, 2006, Cascavel. 2º Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel e 2º Simpósio em Ciência e tecnologia de Aliemntos do Mercosul, 2006.
10. SVIDZINSKI, Arthur e ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; VANDRESEN, Danilea S ; CZAMANSKI, Mariana P ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Presença de fungos contaminantes em maçanetas de portas de laboratório. In: VII SEMana de Artes, IV Mostra do Museu Dinâmico Interdisciplinar, II Mostra Integrada de Ensino Pesquisa e extensão e V Simpósio da APADEC, 2004, MARingá. VII SEMana de Artes, IV Mostra do Museu Dinâmico Interdisciplinar, II Mostra Integrada de Ensino Pesquisa e extensão e V Simpósio da APADEC, 2004.
11. CALSINI, Taís R S ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; MIKCHA, Jane M G ; ROMANO, Ana C B ; MATUMOTO, Renata ; BIDÓIA, Aparecida D ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Flora fúngica encontrada em couve minimamente processada comercializada na região de Maringá. In: VII SEMana de Artes, IV Mostra do Museu Dinâmico Interdisciplinar, II Mostra Integrada de Ensino Pesquisa e extensão e V Simpósio da APADEC, 2004, maringá. VII SEMana de Artes, IV Mostra do Museu Dinâmico Interdisciplinar, II Mostra Integrada de Ensino Pesquisa e extensão e V Simpósio da APADEC, 2004.
12. CALSINI, Taís R S ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; MIKCHA, Jane M G ; ROMANO, Ana C B ; MATUMOTO, Renata ; BIDÓIA, Aparecida D ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Contaminação fúngica em vegetais minimamente processados. In: II VII SEMana de Artes, IV Mostra do Museu Dinâmico Interdisciplinar, Mostra Integrada de Ensino Pesquisa e extensão e V Simpósio da APADEC, 2004, Maringá. II VII SEMana de Artes, IV Mostra do Museu Dinâmico Interdisciplinar, Mostra Integrada de Ensino Pesquisa e extensão e V Simpósio da APADEC, 2004.
13. **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; CALSINI, Taís R S ; MIKCHA, Jane M G ; ROMANO, Ana C B ; MATUMOTO, Renata ; BIDÓIA, Aparecida D ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Qualidade e segurança microbiológica de vegetais minimamente processados após armazenamento em refrigeração. In: VII SEMana de Artes, IV Mostra do Museu Dinâmico Interdisciplinar, II Mostra Integrada de Ensino Pesquisa e extensão e V Simpósio da APADEC, 2004, Maringá. VII SEMana de Artes, IV Mostra do Museu Dinâmico Interdisciplinar, II Mostra Integrada de Ensino Pesquisa e extensão e V Simpósio da APADEC, 2004.

- 14.** CALSINI, Taís R S ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; MIKCHA, Jane M G ; MATUMOTO, Renata A ; ROMANO, Ana C B ; ROBERTO, Andréia C B S ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Aspectos higiênico-sanitários de couve minimamente processada comercializada na região de Maringá-PR. In: 1º Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel-PR e 1º Simpósio em Ciências de Alimentos do Mercosul, 2004, Cascavel. 1º Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel-PR e 1º Simpósio em Ciências de Alimentos do Mercosul, 2004. p. 68.
- 15.** SVIDZINSKI, Arthur e ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; VANDRESEN, Daniela S ; CZAMANSKI, Mariana P ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Leveduras isoladas de maçanetas de portas de laboratório. In: XVII Semana De Integração De Farmácia UEM: Nossa Pérola, 2003, Maringá. XVII Semana De Integração De Farmácia UEM: Nossa Pérola, 2003.
- 16.** CALSINI, Taís R S ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; MIKCHA, Jane M G ; ROMANO, Ana C B ; MATUMOTO, Renata ; BIDÓIA, Aparecida D ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Avaliação do prazo de validade de vegetais minimamente processados usando fungos como indicadores. In: XVII Semana De Integração De Farmácia UEM: Nossa Pérola, 2003, Maringá. XVII Semana De Integração De Farmácia UEM: Nossa Pérola, 2003.
- 17.** SVIDZINSKI, Arthur e ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; VANDRESEN, Danilea S ; CZAMANSKI, Mariana P ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Fungos filamentosos isolados de maçanetas de portas de laboratório. In: XVII Semana De Integração De Farmácia UEM: Nossa Pérola, 2003, MARINGÁ. XVII Semana De Integração De Farmácia UEM: Nossa Pérola, 2003.
- 18.** CALSINI, Taís R S ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; MIKCHA, Jane M G ; ROMANO, Ana C B ; MATUMOTO, Renata A ; BIDÓIA, Aparecida D ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Flora fúngica em vegetais minimamente processados. In: IV Seminário Científico do Centro de Ciências da Saúde: A saúde do homem na perspectiva do novo milênio, 2003, Maringá. IV Seminário Científico do Centro de Ciências da Saúde: A saúde do homem na perspectiva do novo milênio, 2003.

#### Artigos aceitos para publicação

- 1.** Kaihami G.H ; Almeida J.R.F ; **Santos, Suelen S.** ; Soares Netto L.E ; **ALMEIDA, S. R.** ; Baldini R.L . Involvement of a 1-Cys Peroxiredoxin in Bacterial Virulence. PLoS Pathogens (Online) **JCR**, 2014.
- 2.** VARGAS, G. ; ROCHA, J. D. B. ; ALBUQUERQUE, P. C. ; FRASES, S. ; **Santos, Suelen S.** ; NOSANCHUK, J. D. ; MEDEIROS, L. C. S. ; MIRANDA, K. R. ; SOBREIRA, T. ; NAKAYASU, E. S. ; ALMEIDA, I. C. ; CASADEVALL, A. ; RODRIGUES, M. L. ; FREIRE-DE-LIMA, C. G. ; NIMRICHTER, L. . Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by Candida albicans.. Cellular Microbiology (Print) **JCR**, 2014.

#### Apresentações de Trabalho

- 1.** NOAL, V. R. ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; ALMEIDA, S. R. . Capacidade de migração de linfócitos B-1 após infecção intraperitoneal com leveduras de Paracoccidioides brasiliensis. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 2.** **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; FERREIRA, K. S. ; ALMEIDA, S. R. . Análise da capacidade migratória decélulas dendriticas na paracoccidioidomicose experimental. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 3.** NOAL, V. R. ; **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; ALMEIDA, S. R. . Capacidade de migração de linfócitos B-1após infecção intraperitoneal com leveduras de Paracoccidioides brasiliensis. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 4.** **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; GHOSN, E. E. B. ; FERREIRA, K. S. ; ALMEIDA, S. R. . Characterization of dendritic cells from bronchoalveolar lavage after experimental infection with Paracoccidioides brasiliensis. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 5.** **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; CAMACHO, Daiane P ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Influência da clorexidina sobre a hidrofobicidade e aderência em cateter urinário de Candida glabrata. 2007. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 6.** **SANTOS, Suelen Silvana dos** ; CALSINI, Taís R S ; SVIDZINSKI, Terezinha I E . Estudo da aderência de Cladosporium cladosporioides e Candida glabrata isolados de alimentos sobre superfícies utilizadas em cozinha. 2006. (Apresentação de Trabalho/Outra).

#### Produção técnica

**Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia**

1. **SANTOS, Suelen Silvana dos** . Pesquisadores testam vacina contra doença causada por fungo.. 2012. (Programa de rádio ou TV/Entrevista). 🎬
2. **SANTOS, Suelen Silvana dos** . Desarrollan en Brasil vacuna contra enfermedad provocada por hongo. 2012. (Programa de rádio ou TV/Entrevista). 🎬
3. **SANTOS, Suelen Silvana dos** . Researchers test vaccine against lung disease caused by fungus. 2012. (Programa de rádio ou TV/Entrevista). 🎬

**Demais tipos de produção técnica**

1. **SANTOS, Suelen Silvana dos** . Aplicações da Citometria de Fluxo em modelos experimentais . 2010. .
2. **SANTOS, Suelen Silvana dos** . Fenotipagem de células, Linfoproliferação e citocinas intracelulares . 2010. .

## Bancas

---

**Participação em bancas de comissões julgadoras****Outras participações**

1. **SANTOS, Suelen Silvana dos**. 21º Simpósio Internacional de Iniciação de Iniciação Científica da USP. 2013.

## Eventos

---

**Participação em eventos, congressos, exposições e feiras**

1. 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. ANÁLISE DA CAPACIDADE MIGRATÓRIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL. 2009. (Congresso).
2. Strategy to Discovery New Drug With Potencial Use as Antimycobacteria. 2009. (Seminário).
3. XIV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA.Characterization of dendritic cells from bronchoalveolar lavage after experimental infection with Paracoccidioides brasiliensis. 2009. (Simpósio).
4. Pipetas- Informações e Cuidados Gerais. 2009. (Outra).
5. Novas tecnologias em Vacinas Recombinantes. 2009. (Outra).
6. Curso Teórico-prático de Citometria de Fluxo - FACSCanto II - BD. 2009. (Outra).
7. Simpósio de Biologia Estrutural e Molecular. 2008. (Simpósio).
8. 3º Curso de Citometria de Fluxo do Instituto Adolfo Lutz. 2008. (Outra).
9. II Fórum de ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2008. (Outra).
10. Encontro Anual de Iniciação Científica.Influência da clorexidina sobre a hidrofobicidade e aderência em cateter urinário de

Candida glabrata. 2007. (Encontro).

11. I Congresso de Farmácia de Maringá, II Encontro Científico do LEPAC e XIX Semana de integração de Farmácia. Infecções na pele e unha causadas por Prototheca sp. 2006. (Congresso).
12. I Simpósio de plantas medicinais do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. 2006. (Simpósio).
13. Encontro Anual de Iniciação Científica. Estudo da aderência de Cladosporium cladosporioides e Candida glabrata isolados de alimentos sobre superfícies utilizadas em cozinha. 2006. (Encontro).
14. Ciclo de palestras: Farmacêuticos em ação!. 2006. (Outra).
15. I Congresso Internacional de Saúde, V Seminário Científico do CCS e XVIII Semana de Integração de Farmácia. Micose Superficial Causada por Microsporium Canis: Análise de Dois Casos. 2005. (Congresso).
16. I Fórum: perspectivas para a Farmácia na Universidade Estadual de Maringá. 2005. (Outra).
17. Adesão e formação de biofilmes como fator de virulência em Candida spp. - Novas perspectivas de Controle. 2005. (Outra).
18. 1º Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel-PR e 1º Simpósio em Ciências de Alimentos do Mercosul. Aspectos higiênico-sanitários de couve minimamente processada comercializada na região de Maringá-PR. 2004. (Congresso).
19. VII Semana de Artes, IV Mostra do Museu Dinâmico Interdisciplinar, II Mostra Integrada de Ensino Pesquisa e extensão e V Simpósio da APADEC. Contaminação fúngica em vegetais minimamente processados. 2004. (Simpósio).
20. IV Seminário Científico do Centro de Ciências da Saúde: A saúde do homem na perspectiva do novo milênio. Fungos filamentosos isolados de maçanetas de portas de laboratório. 2003. (Seminário).
21. IV Seminário Científico do Centro de Ciências da Saúde: A 'Saúde do homem na perspectiva do Novo Milênio. 2003. (Seminário).
22. I Simpósio do Departamento de Análises Clínicas As perspectivas do farmacêutico em Análises Clínicas. 2003. (Simpósio).
23. XVII Semana de Integração de Farmácia UEM: Nossa pérola. Avaliação do prazo de validade de vegetais minimamente processados usando fungos como indicadores. 2003. (Outra).
24. XVII Semana De Integração De Farmácia UEM: Nossa Pérola. Fungos filamentosos isolados de maçanetas de portas de laboratório. 2003. (Outra).

#### Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **SANTOS, Suelen Silvana dos** . V Simpósio de Análises Clínicas. 2013. (Outro).
2. **Santos, Suelen S.** . IV Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas. 2012. (Outro).

## Educação e Popularização de C & T

---

#### Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. **SANTOS, Suelen Silvana dos** . Pesquisadores testam vacina contra doença causada por fungo.. 2012. (Programa de rádio ou TV/Entrevista). 📺
2. **SANTOS, Suelen Silvana dos** . Desarrollan en Brasil vacuna contra enfermedad provocada por hongo. 2012. (Programa

de rádio ou TV/Entrevista). 

**3. SANTOS, Suelen Silvana dos** . Researchers test vaccine against lung disease caused by fungus. 2012. (Programa de rádio ou TV/Entrevista). 

#### Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

**1. Santos, Suelen S.** . IV Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas. 2012. (Outro).

**2. SANTOS, Suelen Silvana dos** . V Simpósio de Análises Clínicas. 2013. (Outro).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 07/10/2014 às 13:13:37

Imprimir currículo