Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

Avaliação do efeito terapêutico de plasmídeo vacinal contendo
o gene da proteína de estresse térmico de 60kDa de
Paracoccidioides brasiliensis na paracoccidioidomicose
experimental em camundongos

IGOR EMILIANO LEMOS DE SOUZA

RIBEIRÃO PRETO
-2018-

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

Avaliação do efeito terapêutico de plasmídeo vacinal contendo o gene da proteína de estresse térmico de 60kDa de *Paracoccidioides brasiliensis* na paracoccidioidomicose experimental em camundongos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Panunto Castelo

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Souza, Igor Emiliano Lemos de

Avaliação do efeito terapêutico de plasmídeos vacinais contendo o gene da proteína de estresse térmico de 60kDa de *Paracoccidioides brasiliensis* na paracoccidioidomicose experimental em camundongos / Igor Emiliano Lemos de Souza; orientador, Ademilson Panunto Castelo – 2018

71p.: il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018

1. *Paracoccidioides*. 2. Paracoccidioidomicose. 3. Terapia gênica. 4. Proteína de estresse térmico. 5. Resposta imunológica. 6. I. Panunto-Castelo, Ademilson, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

NOME: SOUZA, Igor Emiliano Lemos de

Título: Avaliação do efeito terapêutico de plasmídeo vacinal contendo o gene da proteína de estresse térmico de 60kDa de *Paracoccidioides brasiliensis* na paracoccidioidomicose experimental em camundongos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia, Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nº 2017/01390-8.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família que mesmo longe sempre me apoiou.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Ademilson Panunto Castelo que de forma excepcional atuou no desenvolvimento do presente trabalho. Agradeço pela paciência e total apoio.

A todos que participaram direta ou indiretamente do presente projeto: Maria Cristina Lopes Schiavoni, Fabrício Freitas Fernandes, Taíse Natali Landgraf, Isaira Tincani Brandão Wendy Martin Rios, Ana Cristine S. Ferreira.

RESUMO

SOUZA, I. E. L. Avaliação do efeito terapêutico de plasmídeos vacinais contendo o gene da proteína de estresse térmico de 60kDa de *Paracoccidioides brasiliensis* na paracoccidioidomicose experimental em camundongos. 71p. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica na América Latina, sendo o Brasil o país com maior número de casos. A enfermidade é adquirida por meio da inalação de propágulos de fungos do gênero *Paracoccidioides* e afeta principalmente os pulmões. Anteriormente, nosso grupo mostrou que o tratamento de camundongos infectados com *P. brasiliensis* com uma dose da proteína de estresse térmico de 60kDa recombinante de *P. brasiliensis* (PbHsp60r) induzia um efeito prejudicial na PCM, aumentando carga fúngica e lesão pulmonar, quando comparado a animais infectados e tratados com o veículo. No presente trabalho, buscou-se determinar se outra forma de apresentação da PbHsp60r poderia gerar um efeito benéfico em camundongos infectados com *P. brasiliensis*. Optou-se pelo plasmídeo pVAX1 subclonado com o gene da PbHsp60 (pVAX1-PB_HSP60). Após subclonagem do gene, foi mostrado, por *Western blot*, que anticorpos específicos para PbHsp60 eram produzidos por camundongos imunizados com três doses da construção e que a proteína era sintetizada por células HEK293 transfectadas com pVAX1-PB_HSP60. O tratamento dos animais infectados com três doses de pVAX1-PB_HSP60 ou pVAX1 subclonado com Hsp65 de *M. leprae* (pVAX1-ML_HSP65), que reconhecidamente melhora a PCM experimental, induziu uma diminuição de carga fúngica e da lesão pulmonar quando comparado com animais infectados e tratados com pVAX1 ou PBS. Uma dose de uma dessas construções não induziu melhora significativa na PCM quando comparado aos controles. Como esperado, os animais infectados e tratados com uma dose da PbHsp60r tiveram uma piora dos parâmetros de infecção, o que curiosamente não foi observado com os animais tratados com três doses dessa proteína recombinante, cuja melhora foi muito similar a dos animais infectados e tratados com três doses das construções plasmidiais. Ao pesquisar porque uma dose induz piora da infecção, observou-se que PbHsp60r induz morte de linfócitos esplênicos *in vitro*, em um mecanismo dependente de TLR4, proteína adaptadora TRIF e receptor 1 de TNF. Esses resultados abrem perspectivas de se avaliar a importância da morte de células da resposta imunológica no curso da infecção por *P. brasiliensis*.

Palavras chave: *Paracoccidioides*. Paracoccidioidomicose. Vacina gênica. Proteína de estresse térmico. Resposta imunológica.

ABSTRACT

SOUZA, I. E. L. Evaluation of the therapeutic effect of DNA vaccine plasmid containing the 60-kDa-heat shock protein gene from *Paracoccidioides brasiliensis* in experimental paracoccidioidomycosis in mice. 71p. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis endemic in Latin America and Brazil, which holds most of the PCM cases. PCM is acquired through the inhalation of propagules of fungi from genus *Paracoccidioides* and mainly affects the lungs. We have previously shown that *P. brasiliensis*-infected mice treated with single dose of recombinant 60-kDa-heat shock protein from *P. brasiliensis* (rPbHsp60) had a worsening of infection when compared with animals only infected. In this study, we investigate whether the treatment of infected mice with PbHsp60 gene cloned into a plasmid (pVAX1-*PB_HSP60*) would render an efficient immune response and improvement of the disease. After cloning of the PbHsp60 gene, we first showed that immunization of mice with three doses of pVAX1-*PB_HSP60* induced production of specific anti-PbHsp60 antibody and that pVAX1-*PB_HSP60*-transfected HEK293 cells synthesized the PbHsp60. Interestingly, mice treated with three doses, but not single dose, of pVAX1-*PB_HSP60*, and pVAX1 subcloned with Hsp65 from *Mycobacterium leprae* (pVAX1-*ML_HSP65*), which induces a beneficial effect in experimental PCM, had an improvement in fungal load and lung injury when compared with infected mice treated with pVAX1 or PBS. Unlike animals infected and treated with single dose of rPbHsp60, which had a worsening of infection parameters, treatment with three doses of rPbHsp60 interestingly induced a beneficial effect in the infected animals, as seen with the plasmid constructs. In investigating the causes of this worsening of PCM triggered by injection of a single dose of protein, we showed that rPbHsp60 induced the death of splenic lymphocytes *in vitro* in a mechanism dependent on Toll-like receptor 4, TRIF adapter protein and TNF receptor 1. These results open perspectives to evaluate the importance of cell death of the immune response in the course of *P. brasiliensis* infection.

Keywords: *Paracoccidioides*. Gene vaccine. Heat-shock protein. Immune response.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BHI - Infusão de cérebro e coração (do inglês, *Brain Heart Infusion*)
- BMDCs - células dendríticas de medula óssea (do inglês, *Bone Marrow Dendritic Cells*)
- ConA - Concanavalina A
- CBA - do inglês, *Cytometric Bead Array*
- CFA - Adjuvante Completo de Freund (do inglês, *Complete Freund Adjuvant*)
- CLR - Receptores lectina do tipo C (do inglês, *C-type lectin receptors*)
- dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
- D.O. - Densidade óptica
- gp43 - Glicoproteína de 43kDa
- HE - Hematoxilina-eosina
- Hsp60 - proteína de choque térmico de 60kDa (do inglês, *Heat shock protein of 60kDa*)
- IFN- γ - Interferon- γ
- Ig - Imunoglobulina
- IL - Interleucina
- I.M. - intramuscular
- I.N.- intranasal
- IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
- I.T.- intratraqueal
- LB - Luria-Bertani
- MM - Massa Molecular
- MPLA-SM - monofosforil lipídeo A de *Salmonella minnesota*
- MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio
- MyD88 - Fator 88 de Diferenciação Mielóide
- NALP3 - do inglês *NOD-like receptor P3*
- PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *Pathogen-associated molecular patterns*)
- PbHsp60 - Hsp60 de *Paracoccidioides brasiliensis*
- PBS - Solução salina tamponada em tampão fosfato (do inglês, *Phosphate buffered saline*)
- PCM - Paracoccidioidomicose
- PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polimerase chain reaction*)
- PMX - Polimixina B
- PRR - Receptores de reconhecimento de padrão (do inglês, *Pattern recognition receptors*)

PbHSP60r - Hsp60 de *Paracoccidioides brasiliensis* recombinante

RIPK1- proteína serina/treonina cinase de interação com receptor 1 (do inglês, *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*)

SBF - Soro Bovino Fetal

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamina contendo lauril sulfato de sódio (do inglês, *Sodium Duodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)

Th - T auxiliar (do inglês, *T helper*)

TLR - Receptores semelhantes a Toll (do inglês, *Toll-like receptors*)

TNF - Fator de Necrose Tumoral

Tregs - células T reguladoras

TRIF - Proteína adaptadora que contém domínio citoplasmático do receptor Toll/IL1 e induz IFN- β (do inglês, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*)

UFC - Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Paracoccidiodomicose (PCM).....	14
1.2. Imunologia na PCM.....	16
1.3. Imunoterapia durante a PCM.....	20
1.4. Proteínas do choque térmico (<i>heat shock protein</i> – Hsp)	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivos gerais.....	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Animais.....	25
3.2. Cultivo e preparação de suspensões de <i>P. brasiliensis</i>	25
3.3. Clonagem do gene <i>PB_HSP60</i> em plasmídeo vacinal.....	26
3.3.1. Amplificação do gene <i>PB_HSP60</i>	26
3.3.2. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	26
3.3.3. Eletroforese em gel de agarose.....	27
3.3.4. Ligação do gene <i>PB_HSP60</i> no plasmídeo pVAX1.....	27
3.3.5. Transformação bacteriana	27
3.3.6. Análise dos clones positivos	28
3.4. Expressão de PbHsp60 em cultura de células HEK293T transfectadas com pVAX1- <i>PB_HSP60</i> , avaliação da produção de anticorpos em animais imunizados com pVAX1- <i>PB_HSP60</i> e produção PbHsp60r.	29
3.4.1. Expressão <i>in vitro</i>	29
3.4.2. Produção de anticorpos contra PbHsp60	30
3.4.3. Indução e purificação de PbHsp60r	30
3.4.4. SDS-PAGE e Western blotting	31
3.5. Protocolo de infecção e terapia de PCM experimental em camundongos	32
3.5.1. Protocolo experimental da infecção e tratamentos	32
3.5.2. Determinação da carga fúngica	33
3.5.3. Análise histopatológica	33
3.5.4. Análise do perfil de citocinas	33
3.6. Análise da atividade de PbHsp60r	34
3.6.1. Preparo de culturas celulares.....	34
3.6.2. Citometria de fluxo	35
3.7. Análise estatística.....	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Construção do plasmídeo vacinal pVAX1- <i>PB_HSP60</i>	36
4.2. A construção pVAX1- <i>PB_HSP60</i> é expressa em células eucarióticas transfectadas e quando usada para imunizar camundongos induz produção anticorpos.....	37
4.3. Camundongos infectados e tratados com três doses de pVAX1- <i>PB_HSP60</i> apresentam melhora do quadro infeccioso	39

4.4. PbHsp60r impede a proliferação de células esplênicas de animais <i>naïve</i> ou animais imunizados com pVAX1-PB_HSP60.....	48
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS.....	62
8. APÊNDICE	70

1. INTRODUÇÃO

Micoses endêmicas negligenciadas são um problema de saúde pública em várias partes do mundo, especialmente em países em desenvolvimento. Na maioria dos casos os agentes patogênicos causam doenças superficiais que acometem tecidos queratinizados e mucosas. Entretanto, existe um grupo de fungos que após infectarem o homem podem levar a doença sistêmica grave, que sem a intervenção adequada, podem levar o paciente a óbito. Pertencente a esse grupo existe a paracoccidioidomicose (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

1.1. Paracoccidioidomicose (PCM)

A PCM é uma micose endêmica em uma extensa área da América Latina, desde o sul do México até o norte da Argentina. A distribuição da doença na América Latina não é uniforme, com maior prevalência e incidência na América do Sul. Embora haja um número relativamente alto de casos na Venezuela, Colômbia e norte da Argentina, o Brasil, certamente, apresenta a maior quantidade de casos descritos, cerca de 80% (BRUMMER et al., 1993; MARQUES, 2003; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008; SIFUENTES-OSORNIO et al., 2012). Além disso, no Brasil, a PCM é considerada a micose sistêmica com a maior taxa de mortalidade, sendo a oitava causa mais comum de morte entre as doenças infecciosas crônicas e recorrentes (COUTINHO et al., 2002).

Por um longo período de tempo a espécie *Paracoccidioides brasiliensis* foi considerada o agente etiológico da PCM. No entanto, pesquisas recentes indicaram que outra espécie, *P. lutzii*, também é responsável pela infecção. Atualmente, acredita-se que *P. brasiliensis* seja um complexo formado por cinco espécies filogenéticas – S1a, S1b, PS2, PS3 e PS4, que possuem distribuição territorial com maior prevalência em diferentes áreas do território latino-americano. As espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* têm sido encontradas em regiões distintas na América do Sul. S1a e S1b estão mais presentes na Argentina, Paraguai e nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. PS2 é a espécie com menos casos descritos e tem sido diagnosticada na Venezuela e na região Sudeste do Brasil. PS3 são exclusivas da Colômbia e PS4 da Venezuela. Já infecções com *P. lutzii* têm sido relatadas nas regiões Amazônica e Centro-Oeste do Brasil e no Equador (TEIXEIRA et al., 2014).

Os dados de epidemiologia da PCM apresentam uma certa imprecisão devido ao fato de sua notificação não ser compulsória e por muitos pacientes acometidos estarem em áreas de difícil acesso a serviço de saúde. Os dados de incidência, prevalência e morbidade são baseados geralmente de ocorrências obtidas a partir de dados mortalidade, de hospitalizações, pesquisas epidemiológicas (MARTINEZ, 2017). Em áreas endêmicas, estima-se que a incidência da

doença varie de 3-4 casos novos/1.000.000 de habitantes a 1-3 casos novos/100.000 habitantes/ano. É interessante notar que os dados de epidemiologia podem ser elusivos já que modificações de áreas ambientais, mudança de pacientes crônicos de áreas endêmicas para outras regiões podem levar a números diferentes dos reais. No Brasil, 80% dos casos registrados ocorrem nos estados do Paraná, Goiás, Rio Grande do Sul, São Paulo e Rondônia. Por ano no Brasil a incidência está entre 0,71 e 3,7 casos novos/100.000 habitantes. Dados de Rondônia mostraram a existência de uma incidência de 9,4 casos novos/100.000 habitantes, com cidades com incidência atingindo valores próximos a 40 casos novos/100.000 habitantes (MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* são fungos termodimórficos, ou seja, no ambiente natural crescem na forma de hifa e a 37°C a sua forma é modificada para levedura. O aspecto morfológico celular característico das leveduras é a ocorrência de brotamentos de várias células ligadas às células mãe (BRUMMER et al., 1993). Embora não se conheça exatamente o nicho ecológico de fungos do gênero *Paracoccidioides*, especula-se que o fungo cresça na forma saprofítica no solo ou em plantas. A infecção parece ocorrer mais frequentemente quando fragmentos de hifas presentes no solo são liberados e entram em contato com a mucosa do trato respiratório (BOCCA et al., 2013). Os pacientes mais acometidos são trabalhadores que de alguma forma tiveram alguma atividade relacionada com o manejo do solo de áreas endêmicas. Possivelmente durante o trabalho são gerados fragmentos do fungo que ao serem inalados podem levar a infecção. Dentro do organismo, ou seja, a 37°C o fungo se deposita na mucosa respiratória e altera a sua forma de hifa para levedura. A alteração da forma do fungo é um dos fatores para a progressão da doença (RESTREPO; GÓMEZ; TOBON, 2012).

As manifestações da doença são ocasionadas pela infecção primária, reativação de focos quiescentes ou pela reinfecção externa após o tratamento. Além disso, os fatores relacionados ao fungo como cepa infectante, patogenicidade podem influenciar na manifestação da enfermidade (FORTES et al., 2011). Antes da puberdade a doença atinge ambos os gêneros da mesma maneira. Após a puberdade, o fungo atinge mais pacientes do gênero masculino do que o feminino. Este fato ocorre, possivelmente, em função do hormônio estrógeno produzido pelas mulheres que interferem na transição de fase de micélio para levedura (SHANKAR et al., 2011). Embora haja a possibilidade de que um envolvimento menos intenso das mulheres na atividades agrícolas possa também contribuir para a variabilidade na proporção de PCM entre homens e mulheres nas diferentes zonas endêmicas (MARTINEZ, 2015), testes cutâneos mostram que homens e mulheres apresentam a mesma taxa de infecção (KALMAR et al., 2004).

A PCM apresenta um largo espectro de manifestações clínicas e patológicas, variando de formas localizadas a infecções disseminadas e fatais. A doença apresenta duas formas clínicas principais: aguda/subaguda (juvenil) e a crônica (adulta). A forma aguda/subaguda representa de 5 a 11% dos casos e atinge crianças e jovens adultos. Essa é a forma mais grave da doença e é caracterizada pela rápida disseminação linfática e hematogênica do fungo que acarreta com o comprometimento do baço, fígado dentre outros órgãos. A forma crônica é caracterizada pelas lesões no pulmão, regiões da mucosa do trato respiratório e pele. Nos casos onde há a disseminação do fungo, outros órgãos afetados são as glândulas adrenais e o cérebro. A inflamação crônica leva progressivamente a uma perda de função devido a substituição do tecido funcional por um tecido fibroso cicatricial que não desempenha a função do órgão (MARTINEZ, 2017; MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

1.2. Imunologia na PCM

O estabelecimento da PCM e o seu prognóstico está diretamente relacionado com fatores ligados ao fungo, por exemplo, virulência, composição antigênica, dentre outros. No entanto, a maneira como o hospedeiro irá desenvolver uma resposta imunológica contra o fungo é talvez o fator determinante para o desenvolvimento e progressão da doença (KASHINO et al., 1985). A grande variedade de tipos antigênicos presentes nas células do fungo faz necessário a indução de uma resposta complexa envolvendo a imunidade inata e a adaptativa, sendo que as duas atuam em conjunto para tentar eliminar o patógeno (ROMANI, 2011).

Quando propágulos do *P. brasiliensis* são inspirados pelo hospedeiro, macrófagos residentes e células dendríticas dos pulmões constituem-se nas primeiras células do sistema imunológico a entrarem em contato com os fungos (CALICH et al., 2008). Essas células são ativadas quando reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (do inglês, *pattern recognition receptors*, PRR) (DRUMMOND et al., 2015). Dentre os receptores pertencentes ao grupo dos PRRs existem os receptores semelhantes a Toll (do inglês, *Toll-like receptors*, TLRs), receptores lectina do tipo C (CLR), receptores de componentes do sistema complemento, dentre outros. Normalmente, PRRs são proteínas transmembrânicas que interagem com moléculas que sinalizam perigo ao hospedeiro, podendo tais moléculas ter origem dos patógenos ou do próprio organismo (DEMBIC, 2015). Quando a interação dos fungos ocorre com PRRs de células fagocíticas, pode ocorrer a internalização fúngica e/ou transdução de sinal que leva ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B, e consequentemente de genes de citocinas e quimiocinas inflamatórias, tais como o fator de

necrose tumoral (TNF), interleucina (IL-) 6 e IL-1 β , que induzem um influxo das células inflamatórias para o sítio onde o fungo se encontra (CALICH et al., 2008; LIONAKIS; ILIEV; HOHL, 2017; VAN DE VEERDONK et al., 2008). Essas citocinas são importantes para o estabelecimento de um processo inflamatório com migração de neutrófilos e, posteriormente, macrófagos para o sítio da infecção.

Normalmente, neutrófilos apresentam atividade fungicida dependente da produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico (NO) e lisozimas (ROMANI, 2011). A compreensão da imunopatologia decorrente da infecção com *P. brasiliensis* advém principalmente da utilização de camundongos que foram infectados experimentalmente e classificados como resistentes ou susceptíveis (CALICH et al., 1985). Curiosamente, neutrófilos que migram em resposta a infecção intraperitoneal de camundongos suscetíveis da linhagem B.10A apresentam-se como uma população mais imatura quando comparado aos neutrófilos de animais resistentes, da linhagem A/Sn, submetidos a infecção. Apesar dos camundongos suscetíveis produzirem maior número de neutrófilos, esses foram menos eficazes em matar os fungos. As citocinas inflamatórias foram mais pronunciadas em camundongos resistentes, o que favorece a resistência aumentada do PCM (SPERANDIO et al., 2015).

Macrófagos são células que desempenha um papel chave na PCM (CALICH et al., 2008). Resultados, até certo ponto paradoxais foram obtidos por Pina et al. (2008), em um estudo onde foi mostrado que macrófagos residentes de camundongos suscetíveis são mais pró-inflamatórios, com produção aumentada de NO e maior taxa de morte dos fungos. Ao contrário, macrófagos alveolares de animais resistentes produzem mais citocina anti-inflamatória TGF- β , que diminui o potencial fungicida desses macrófagos. A suscetibilidade de camundongos é provavelmente mediada excesso de estímulo pró-inflamatório de células da imunidade inata enquanto a resistência correlaciona-se com uma tolerância precoce ao crescimento de fungos que subsequentemente evolui para uma imunidade adaptativa eficiente (PINO-TAMAYO et al., 2016).

A importância das células dendríticas na PCM reside na capacidade dessas células em fazer uma ponte entre a imunidade inata e a adquirida (HOWARD et al., 2007). Quando células dendríticas de medula óssea (BMDCs) de camundongos suscetíveis foram estimuladas por leveduras de *P. brasiliensis*, essas diferenciaram-se em células com um padrão mieloide predominantemente pró-inflamatório, enquanto padrões mieloides e plasmocitóides foram obtidos camundongos resistentes. A produção concomitante de citocinas pró e anti-inflamatórias por células dendríticas de camundongos resistentes resulta na diferenciação aumentada de células T efectoras positivas para IFN- γ , IL-4 e IL-17, o que foi associado ao

aumento do desenvolvimento de células T que regulam ou suprimem a resposta imunológica (células T reguladoras). Esses dados sugerem que respostas inatas pró-inflamatórias excessivas prejudicam o desenvolvimento da imunidade adaptativa contra a PCM pulmonar. Além disso, sugere que a proteção é alcançada quando respostas pró- e anti-inflamatórias bem equilibradas são desencadeadas por células dendríticas (PINA et al., 2013).

Apesar da imunidade inata ser fundamental para a resultante da infecção, uma vez que direciona a ativação da imunidade adaptativa, essa última se correlaciona diretamente com os perfis de resistência e suscetibilidade. A resposta imunológica celular é primordial para o controle da infecção por fungos (ROMANI, 2004). Em infecções experimentais com *P. brasiliensis*, observou-se que os camundongos A/Sn, que apresentaram resistência frente à infecção, desenvolveram uma forte resposta celular. Esses animais apresentaram sítios de infecção extrapulmonares, tais como omento, baço e fígado, embora tivessem menos lesões granulomatosas e disseminação mais tardia quando comparado aos animais suscetíveis B10.A (CALICH et al., 1985). As células de linfonodos de camundongos A/Sn infectados com *P. brasiliensis* produziram, precocemente e em concentrações que se mantiveram, as citocinas típicas de linfócitos T CD4 do tipo 1 (Th1), quais sejam IFN- γ e IL-2. As citocinas do perfil Th2, IL-4 e IL-5, um padrão mais anti-inflamatório e de controle da resposta Th1, foram detectadas após oito semana de infecção. Curiosamente, houve nos animais resistentes uma forte associação com a produção de anticorpos IgA, IgG1, IgG3 e IgG2b específicos, sugerindo uma ativação concomitante de células Th1 e Th2 (CALICH; KASHINO; S.S., 1998). Já os animais susceptíveis B10.A foram relacionados com diminuição da resposta celular e ativação de linfócitos B. Animais B10.A apresentaram baixas concentrações de IFN- γ , ao mesmo tempo que produzem quantidades significativamente maiores de IL-5 e IL-10 no início da infecção. Na fase crônica da infecção, eles produzem transitoriamente IL-2 e IL-4, ocorrendo a detecção preferencial de IL-4, IL-5 e IL-10 no pulmão. Esses animais suscetíveis não foram capazes de restringir a infecção, acarretando em uma disseminação precoce e progressiva do fungo. É interessante notar que os animais susceptíveis possuíam uma carga fúngica menor na segunda e quarta semana de infecção, sugerindo que a imunidade inata nestes animais parece ser mais ativa. Observou-se que esses animais tinham níveis mais elevados de anticorpos específicos IgM e IgA e diminuição dos níveis de anticorpos IgG2a, aumento progressivo da carga fúngica e diminuição do tempo de sobrevivência (CALICH et al., 1998; CALVI et al., 2003).

Além dos estudos que usaram o modelo descrito acima, outros trabalhos têm mostrado que a resposta imunológica com predomínio de linfócitos Th2, com a produção de IL-4, IL-5 e IL-10, tem papel negativo durante a infecção. Normalmente, quando este perfil de resposta

ocorre, é visto disseminação fúngica para outros órgãos com pouca formação de granulomas e ativação de linfócitos B (CAVASSANI et al., 2011; FORTES et al., 2011).

A resposta Th2 é observada em pacientes forma aguda/subaguda da PCM. Por outro lado, a resposta onde predomina células Th1, com produção de IFN- γ e TNF, é relacionada com uma maior ativação de macrófagos, produção de NO e outras espécies reativas do oxigênio (KASHINO et al., 2000). Durante este tipo de resposta é notado uma diminuição da carga fúngica e concomitante controle da disseminação do fungo para outros órgãos (BOCCA et al., 2013; CALICH et al., 1998; FORTES et al., 2011).

Além de respostas polarizadas por linfócitos do tipo Th1 e Th2, outros subtipos de linfócitos T – células Th17 e T reguladoras – vêm sendo descritas no curso da PCM. Em camundongos, foi observado que TLR2, TLR4 e dectina-1, que é um receptor ligante de β -glucana, regulam a diferenciação de células Th17 contra infecção com *P. brasiliensis* (LOURES et al., 2015). De fato, a expansão das células Th17 e células T citotóxicas que secretam IL-17 dependem da ação sinérgica dos receptores TLR4, receptor de manose e dectina 1 presente na superfície das células dendríticas. Componentes fúngicos podem se ligar a esses receptores e promover a ação das células dendríticas no sentido de diferenciar os linfócitos em células produtoras de IL-17 (LOURES et al., 2015). Esses resultados corroboram o conhecimento atual sobre imunidade na PCM onde os padrões de resposta Th1 e Th17 tem um papel importante no controle da infecção (FELONATO et al., 2012; FERIOTTI et al., 2017; LOURES et al., 2011; TRISTÃO et al., 2017). Tristão et al. (2017) demonstraram que a presença de linfócitos Th17 durante a infecção PCM experimental é importante para a defesa do organismo frente ao fungo. Os pesquisadores demonstraram que as citocinas de IL-6 e IL-23 são importantes na formação dos granulomas, expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e secreção de TNF e IFN- γ . Em 2011, Pagliari et al., utilizando ensaio imunohistoquímicos, demonstraram a presença de células inflamatórias expressando IL-17 em lesões de pele e mucosa de pacientes (PAGLIARI et al., 2011). Curiosamente, Feriotti et al. (2017) mostraram que o inflamassomo NALP3 (sigla inglês *NOD-like receptor P3*), cuja ativação proporciona a clivagem de pró-IL-1 β em IL-1 β e pró-IL-18 em IL-18 por caspase-1, desempenham um papel chave na proteção contra a PCM pulmonar por induzir respostas Th1 e Th17, o que reduz o controle supressor mediado pelas células T reguladoras (FERIOTTI et al., 2017).

Em relação às células T reguladoras, Bazan et al. (2015) demonstraram a presença deste tipo celular nos estágios iniciais e em estágios tardios da infecção em camundongos. O grupo demonstrou que a depleção das células reguladoras durante a PCM experimental acarretou em

diminuição da carga fúngica, baixa disseminação do fungo para outros órgãos e aumento do influxo de linfócitos T CD4 e T CD8 (BAZAN et al., 2015).

O balanço entre a respostas regulação das respostas por células Th17 e células T reguladoras parece ser finamente regulado e dependente da enzima indoleamino 2,3 desoxigenase-1 (IDO1), que apresenta dois mecanismos de ação que influenciam a imunidade: (1) controla o crescimento do fungo por restringir o triptofano por catálise e degradação desse aminoácido na via das quinureninas (MELLOR; MUNN, 2004) e (2) modula a ativação de células T reguladoras via ativação do receptor de aril hidrocarbonetos (AhR) (CHEONG et al., 2018). Araújo et al (2017) mostraram que tal balanço mediado pelo eixo IDO1/AhR é crucial para a determinação da preponderância de respostas de células Th17 ou T reguladoras e o controle da gravidade da PCM pulmonar (DE ARAÚJO et al., 2017).

1.3. Imunoterapia durante a PCM

Vacinas terapêuticas é um tipo de tratamento onde há a estimulação do sistema imunológico com o intuito de eliminar tumores ou infecções. Assim, previne complicações por reforçar ou aumentar as defesas quando o sistema imunológico não é capaz de fazer durante o curso natural da doença ou quando o tratamento antitumoral ou antimicrobiano não é suficiente. Em infecções crônicas, o estágio de diferenciação reflete a extensão da duração de exposição antigênica. Assim, o objetivo das vacinas terapêuticas consiste na ativação de células do sistema imunológico, gerando respostas celulares e humorais a partir de células efectoras com a capacidade de sobreviver e proliferar, proporcionando uma imunidade imediata e duradoura.

Antígenos de *P. brasiliensis* estimulam o sistema imunológico de diversas maneiras. Estes antígenos podem ter em sua composição lipídeos, carboidratos e proteínas. A maioria dos trabalhos presentes na literatura investiga a utilização de antígenos de *P. brasiliensis* para imunodiagnóstico. Por outro lado, existe um número relativamente pequeno de trabalhos que utilizam a antígenos de *P. brasiliensis* na terapia da PCM. A paucidade de trabalhos de imunoterapia na PCM faz deste um campo vasto de estudos cujo objetivo é o uso de moléculas que positivamente modulam a resposta imunológica a fim de induzir proteção com menor lesão tissular.

A glicoproteína de 43 kDa (gp43) é o antígeno mais estudado de *P. brasiliensis* (BRUMMER et al., 1993). Este antígeno foi utilizado como imunodiagnóstico, terapia e estratégia de vacinal. Estudo utilizando células dendríticas pulsadas com gp43 e transferidas demonstraram um efeito deletério no curso da PCM de animais infectados posteriormente (FERREIRA; ALMEIDA, 2006). Entretanto, um peptídeo de 15 aminoácidos derivado da gp43,

denominado peptídeo P10, se apresentou como um bom candidato na terapia quando o gene utilizando a terapia gênica como estratégica (RITTNER et al., 2012).

Em 2011, Fernandes e colaboradores utilizaram as proteínas recombinantes de *P. brasiliensis* Pb27 e Pb40 para o tratamento da PCM experimental de camundongos em associação com fluconazol e foi demonstrado um efeito de melhora no curso da PCM (FERNANDES, V. C. et al., 2011).

O nosso grupo vem avaliando antígenos e adjuvantes para o tratamento da PCM. Os efeitos na redução da carga fúngica foram atribuídos à indução de uma resposta Th1 que está relacionada com a resposta protetora do organismo frente à infecção. Landgraf *et al.* (2017) demonstraram que macrófagos estimulados com a proteína recombinante diidrolipoil desidrogenase de *P. brasiliensis* aumentam a fagocitose e a capacidade microbicida dessas células (LANDGRAF et al., 2017a). Além disso, observou-se que camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com adjuvante completo de Freund (CFA) (DE OLIVEIRA et al., 2008) ou monofosforil lipídeo A de *Salmonella minnesota* (MPLA-SM) (LANDGRAF et al., 2017b), conhecidos como indutores de respostas Th1, apresentaram uma notável redução da carga fúngica e das lesões pulmonares. Ainda, a administração terapêutica e profilática das lectinas imunomoduladoras ArtinM e paracoccina, que reconhecem os carboidratos dos receptores semelhantes a Toll (TLR), induziu uma resposta de padrão Th1 e levou à melhora da infecção por *P. brasiliensis* (ALEGRE et al., 2014; COLTRI et al., 2008).

1.4. Proteínas do choque térmico (*heat shock protein* – Hsp)

As Hsp são moléculas altamente conservadas ao longo da evolução com expressão constitutiva nas células de possivelmente todos seres vivos. O efeito de proteção celular dessas proteínas são correlacionadas com sofisticados mecanismos, dentre os quais se destacam a prevenção da formação de agregados proteicos não específicos e o auxílio no dobramento de proteínas a fim de adquirirem suas estruturas nativas (RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010). As Hsp apresentam distribuição ampla dentro da célula eucariótica, podendo estar localizadas no citoplasma, no núcleo, membrana plasmática, cloroplastos e outras organelas (HAYNES; RON, 2010). A classificação das Hsp foi realizada de acordo com sua massa molecular aproximada e função.

Embora o nome dado a essa classe de proteínas seja em decorrência da descoberta do aumento da sua função durante o aumento do calor, hoje se sabe que o aumento da expressão ocorre em resposta a outros fatores que geram estresse celular, tais como estresse oxidativo, exposição à metais pesados, etanol, ou outras substâncias tóxicas (RICHTER et al., 2010).

Inicialmente, as Hsp foram descritas como moléculas com funções intracelulares, porém, hoje se sabe que, em mamíferos, quando ocorre liberação de Hsp para o meio extracelular, essas proteínas passam a ser reconhecidas como padrões moleculares associadas a perigo (DAMPs) por PRR. Há, assim, uma percepção de dano celular ativando respostas de imunidade inata (BIANCHI, 2007). As Hsp também estão envolvidas com a imunidade adaptativa, haja vista que essas moléculas possuem a capacidade de se ligar a antígenos e mediar sua captura por células apresentadoras de antígeno, inclusive sendo facilitadoras do processo de apresentação cruzada de antígenos (MURSHID; GONG; CALDERWOOD, 2012).

Os patógenos também aumentam a expressão de proteínas em resposta à atividade imunológica do hospedeiro agindo sobre os seus componentes celulares. Desta forma, o aumento da produção de Hsp acarreta em um maior reconhecimento destas moléculas pelo sistema imunológico, induzindo uma forte resposta imunológica humoral e celular. Em virtude disso, em algumas infecções, o antígeno imunodominante passa a ser as Hsp (ZÜGEL; KAUFMANN, 1999).

Uma das proteínas do choque térmico que tem recebido atenção é a Hsp60. Os membros dessa família proteica, as chaperoninas, formam complexos citosólicos em eucariontes e bactérias, podendo ser encontrado em organelas. Em eucariotos é conhecida como Hsp de mitocôndrias. Essa molécula parece ter uma capacidade de co-estimulação em células T reguladoras através da estimulação de TLR2, suprimindo respostas de células T alvos por contato célula-célula e secreção de IL-10 e TGF- β (OHASHI et al., 2000; ZANIN-ZHOROV et al., 2006). Ao mesmo tempo, camundongos que são hiporresponsivos a LPS, por apresentarem TLR4 mutante, também não respondem a Hsp60 humana, sendo a indução de NO e TNF dependente de TLR4 (OHASHI et al., 2000; ZANIN-ZHOROV et al., 2006). Em estudos de PCM, o primeiro trabalho a clonar, caracterizar e expressar a proteína Hsp60 do isolado Pb01, hoje denominado de *P. lutzii*, foi publicado por Izacc et al., em 2001 (IZACC et al., 2001). Nessa investigação, descobriu-se que gene essa Hsp60 é composto por três éxons e dois íntrons, e contém dois sítios putativos de N-glicosilação (IZACC et al., 2001). Estudos que utilizaram a Hsp60 recombinante de *P. lutzii* (CUNHA et al., 2002) e *P. brasiliensis* (PERON et al., 2017) mostraram que uma porcentagem significativa de soros de pacientes reagem com PbHsp60, o que demonstra a imunogenicidade de PbHsp60 de *Paracoccidioides* spp.

Nosso grupo tem estudado a Hsp60 de *P. brasiliensis* e os dados preliminares mostraram que essa proteína em sua forma recombinante tem um efeito prejudicial quando administrada como terapia, ou seja, no tratamento de animais previamente infectados (DE OLIVEIRA et al., 2008). Apesar desses resultados parecerem discrepantes quando comparados aos resultados de

Soares et al., 2008, que conseguiram proteção contra o fungo, ao imunizar os animais com Hsp60 recombinante, um cuidado especial deve ser tomado, já que utilizaram Hsp60 recombinante de *P. lutzii* e porque as respostas imunológicas advindas de profilaxia podem ser diferentes daquelas obtidas por terapia, ou seja, respostas em doença pré-existente (BUCKWALTER; SRIVASTAVA, 2008). Em nossos experimentos, além de um aumento significativo da carga fúngica, os animais apresentaram maior lesão pulmonar e desregulação do sistema imunológico, produzindo grande quantidade de citocinas (FERNANDES, F. F. et al., 2016). No presente trabalho, buscou-se descobrir se por meio de uma nova formulação ocorreria uma modificação do efeito terapêutico dessa proteína na PCM experimental em camundongos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Determinar se o tratamento de camundongos infectados com *P. brasiliensis* com plasmídeo vacinal contendo o gene completo da Hsp60 de *P. brasiliensis* propicia uma melhora no quadro da PCM experimental.

2.2. Objetivos específicos

- Clonar no vetor de expressão em células de mamífero pVAX1 o gene *Pb_HSP60* e avaliar se há expressão gênica;
- Investigar se o tratamento de camundongos infectados com *P. brasiliensis* com construção pVAX1-*PB_HSP60* altera a patologia nos camundongos;
- Avaliar se o número de doses dos plasmídeos ou proteína recombinante, modifica o resultado da infecção;
- Investigar o efeito da PbHsp60 recombinante (PbHsp60r) em cultura células esplênicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Os camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram provenientes do Biotério Central da Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto. Os animais deficientes de TLR4 (TLR4-KO), TLR3 (TLR3-KO), TRIF (TRIF-KO), TNFR1R2 (TNFR1R2-KO) e TNFR1 (TNFR1-KO) foram obtidos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (FMRP-USP). Foram usados animais machos, com idade entre 6 e 8 semanas de vida e massa variando entre 20 e 25g. Os camundongos BALB/c foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP (FFCLRP-USP), enquanto os animais C57BL/6 selvagens ou geneticamente deficientes submetidos ao protocolo de infecção e terapia ou como fonte de células para os experimentos *in vitro* foram mantidos em microisoladores em estantes ventiladas (Alesco, Capivari, Brasil) no biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP-USP. A manutenção foi feita em caixas de polipropileno ou microisoladores, com piso de 570cm² – 5 animais/caixa. Os animais foram ambientados à instalação por uma semana antes de iniciar o experimento, à temperatura entre 20 a 22°C, ciclo de claro-escuro de 12 horas e com acesso à água filtrada e à ração *ad libitum*. Todas as caixas continham cama de maravalha e foram limpas de duas a três vezes por semana.

Esse projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMRP-USP (146-2007) e FFCLRP-USP (protocolo nº 15.1.1770.59.0).

3.2. Cultivo e preparação de suspensões de *P. brasiliensis*

O isolado 18 de *P. brasiliensis* (Pb18) foi mantido por cultivo em meio YPD modificado [1% (m/v) de extrato de levedura, 2% (m/v) de peptona, 2% (m/v) de glicose e 1,7% (m/v) de ágar e 4% (v/v) de soro fetal bovino] ou F12 Nutrient Mixture (Thermo Fisher Scientific), por 10 dias, a 36°C, a partir de um isolado gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Roberto Martinez do Hospital das Clínicas, FMRP-USP. Esse isolado foi escolhido devido a sua alta virulência e à capacidade de induzir reação granulomatosa (KASHINO et al., 1985).

Culturas crescidas por 7 dias em tubo polipropileno de 50mL foram centrifugadas a $3.000 \times g$, por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento de células adicionado 10mL de solução salina tamponada com fosfato a 10mM, pH 7,2 (PBS) estéril. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes, resultando uma suspensão final em 2mL de PBS estéril. A concentração de células foi determinada por contagem das leveduras em câmara de Neubauer a partir de uma alíquota da suspensão. A viabilidade dos fungos foi determinada pelo

método fluorescente (CALICH, V. L. G.; PURCHIO; PAULA, 1979). Da suspensão de células de leveduras, 100µL foram misturados a uma solução contendo 100µL de brometo de etídio (50mg/mL – Sigma-Aldrich) e 100µL de diacetato de fluoresceína (2mg/mL – Sigma-Aldrich), preparada no momento do uso. Essa suspensão foi incubada por 10 minutos, a 36°C, na ausência de luz. A viabilidade das células fúngicas foi determinada em microscópio de fluorescência. Apenas as suspensões de leveduras com viabilidade superior a 90% foram utilizadas para infectar camundongos.

3.3. Clonagem do gene *PB_HSP60* em plasmídeo vacinal

3.3.1. Amplificação do gene *PB_HSP60*

O gene completo da Hsp60 de *P. brasiliensis* foi obtido a partir de amplificações do inserto presente no vetor de expressão bacteriana pET28a-*PB_HSP60*, gentilmente cedido pelo Dr. Fabrício F. Fernandes, pós-doutorando do Departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP-USP. Estas amplificações foram realizadas com os iniciadores (*primers*) direto 5'-GCATATAAGCTTAGCATGGCA*CAGCGAGCTTTACTTCCT*-3' e reverso 5'-CGATATGAATTCTACTAGAACATA*CCCCCGCCCATAC*-3'. As letras com sublinhado duplo na região 5' correspondem a bases extras para otimizar o corte pelas enzimas de restrição *Hind*III (iniciador direto) e *Eco*RI (iniciador reverso), cujas sequências estão em negrito. Já as duas bases com sublinhado duplo no meio do iniciador direto referem-se a bases extras para correção dos códons de leitura, gerando um aminoácido alanina adicional entre o primeiro e o segundo aminoácido da proteína. Um códon de iniciação (ATG) e dois de terminação (CTA) da tradução da proteína estão marcados em cinza. As letras com sublinhado simples correspondem a sequência de Kozak, enquanto as bases específicas e complementares do gene *PB_HSP60* estão assinaladas em itálico.

3.3.2. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

As amplificações do gene *PB_HSP60* foram realizadas utilizando-se 75ng do molde (*template*) de DNA plasmidial pET28a-*PB_HSP60*, 1µL de cada iniciador a 10pmols/µL, 0,2µL de DNA polimerase *High Fidelity* (5U/µL) (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), 5µL de tampão da enzima (Tris-SO₄ a 600mM e persulfato de amônio a 180mM), 3µL de MgCl₂ a 50mM, 1µL de uma mistura de dNTPs a 10mM e água ultrapura em quantidade suficiente para um volume total de reação de 50µL. As reações foram feitas em um termociclador C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Foster City, Estados Unidos). Inicialmente, as reações permaneceram a 95°C, por 2 minutos, para desnaturação do DNA molde e ativação da DNA

polimerase, seguida por diferentes quantidades de ciclos, sendo esses: desnaturação a 95°C, por 30 segundos, anelamento a 57°C, por 40 segundos, e extensão a 72°C, por 2 minutos. Após os ciclos, as reações foram mantidas por 5 minutos, a 72°C. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, conforme descrito abaixo.

3.3.3. Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose foi preparado por ressuspensão de agarose em tampão TAE (Tris-acetato a 40mM e EDTA a 1mM, pH 8,0) na concentração final de a 0,8% (m/v). Seguiu-se aquecimento da solução em micro-ondas. Em temperatura aproximada de 50°C, adicionou-se ao gel o corante SYBR Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific) a 0,1% (v/v). O gel foi transferido para cuba de eletroforese horizontal contendo tampão TAE. As amostras foram ressuspensas em tampão de corrida 6 vezes concentrado [glicerol a 30% (v/v) e azul de bromofenol a 0,1% (m/v)] e aplicadas ao gel. As corridas foram realizadas a 80V, 300mA, 150W, por 40 minutos. A aquisição de imagem dos géis foi feita em transluminador Safe Imager 2.0 (Thermo Fisher Scientific) por uma câmera Canon EOS Digital Rebel XSi (Canon USA Inc., Lake Success, EUA).

3.3.4. Ligação do gene *PB HSP60* no plasmídeo pVAX1

Após análise da amplificação, foi realizada a ligação do produto de PCR no vetor pVAX1 (Thermo Fisher Scientific). Para isso, foi necessário digerir ambos, pVAX1 e o inserto, em microtubos separados, com as enzimas *EcoRI* (Promega) e *HindIII* (Promega) por 5 horas, a 37°C, conforme as recomendações do fabricante. Inserto e plasmídeos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%. pVAX1 linearizado e o inserto digerido foram isolados do gel com o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido), conforme recomendações do fabricante. Em seguida, inserto e pVAX1 foram incubados em razões plasmídeo:inserto de 1:3, 1:1 e 3:1, em 5µL do tampão de ligação concentrado 2 vezes e 1µL de T4 DNA ligase a 3U/µL (Promega). As reações foram incubadas por 60 minutos, à temperatura ambiente, para posterior transformação de bactérias eletrocomponentes.

3.3.5. Transformação bacteriana

Uma colônia da cepa DH10b de *E. coli* foi crescida em 5mL de caldo Luria Bertani [LB – triptona a 1% (m/v), extrato de levedura a 0,5% (m/v) e NaCl a 1% (m/v), pH 7,0], sob agitação de 180rpm, por 16 horas, a 37°C. Desse pré-inóculo retirou-se 3mL para diluição em

300mL de caldo LB estéril, com incubação nas condições descritas acima. Após atingir um valor de absorbância a 600nm entre 0,4 e 0,6, a cultura foi incubada em banho de gelo, por 15 minutos, e centrifugada a $5.000 \times g$, durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 50mL de água ultrapura gelada e novamente centrifugadas a $5.000 \times g$, durante 5 minutos, a 4°C. O procedimento de lavagem das bactérias foi realizado mais três vezes com 50mL de água ultrapura a 4°C e duas com 25mL de solução de glicerol a 10% em água, a 4°C. Por fim, as células foram ressuspensas em 1mL de solução de glicerol a 10% em água, a 4°C, e amostras de 50µL foram aliquotadas em microtubos e estocadas em *ultrafreezer* a -80°C.

As reações de ligação pVAX1-*PB_HSP60*, preparadas conforme o tópico 3.1.4, foram incubadas com 50µL de suspensão células *E. coli* eletrocompetentes, preparadas conforme o tópico acima, em gelo por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma cubeta de eletroporação de 0,2mm e submetidas a um pulso elétrico (capacitância de 25µF, resistência de 200Ω, voltagem 1.8kV). Para recuperação das bactérias, após o pulso, as células foram transferidas para 1mL de caldo SOC [(triptona a 2% (m/v), extrato de levedura a 0,05% (m/v), NaCl a 0,06% (m/v), KCl a 0,02% (m/v), dextrose a 20mM e MgCl₂ a 10mM, pH 7,0)], seguido por incubação a 37°C, sob agitação constante de 180rpm. Após 1 hora, as culturas foram centrifugadas a $5.000 \times g$, por 3 minutos, à temperatura ambiente, e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos formados foram ressuspensos em 100µL de meio SOC e as suspensões espalhadas sobre ágar LB contendo 50µg/mL de canamicina (Thermo Fisher Scientific). As placas de Petri foram mantidas em estufa, a 36°C, por 16 horas. As colônias foram coletadas em microtubos contendo 50µL de caldo LB estéril acrescido de 50µg/mL de canamicina (Thermo Fisher Scientific). Os tubos foram mantidos, sob agitação, por 45 minutos, a 37°C. Para a seleção dos clones que possuíam pVAX1-*PB_HSP60*, procedeu-se PCR, conforme descrito no tópico 3.1.2, com 1µL de cada suspensão dos clones.

3.3.6. Análise dos clones positivos

Clones que apresentaram amplificação para o gene *PB_HSP60* foram colocados, separadamente, em 5mL de caldo LB acrescido de 50µg/mL de canamicina (Thermo Fisher Scientific) e incubados durante 16 horas, a 37°C, sob agitação de 180rpm. Após o crescimento, as bactérias foram coletadas por centrifugação a $6.000 \times g$, por 4 minutos, e o DNA plasmidial foi isolado com o kit *Illustra Plasmid Prep Mini Spin* (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com o protocolo do fabricante.

Os plasmídeos isolados foram submetidos à clivagem com as enzimas de restrição *HindIII* (Promega) e *EcoRI* (Promega), e em seguida analisados quanto ao tamanho do inserto em eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Para avaliar se a sequência do gene clonado correspondia ao gene da PbHsp60, submeteu-se os plasmídeos isolados ao sequenciamento de nucleotídeos no Centro de Estudos do Genoma Humano - Instituto de Biociências da USP. Foram usados iniciadores sugeridos pelo fabricante para sequenciamento de insertos contidos em pVAX1, quais sejam T7 e BGH. Após análise do sequenciamento dos plasmídeos e confirmação da presença do gene completo, foi realizada a purificação e extração dos plasmídeos pelo kit *Endofree Plasmid Giga* (Qiagen, Valencia, EUA).

3.4. Expressão de PbHsp60 em cultura de células HEK293T transfectadas com pVAX1-PB_HSP60, avaliação da produção de anticorpos em animais imunizados com pVAX1-PB_HSP60 e produção PbHsp60r.

3.4.1. Expressão *in vitro*

Para se avaliar se a construção estava de fato expressando adequadamente a PbHsp60 em célula eucariótica, foi realizada a transfecção de células da linhagem HEK293T (ATCC-293T). O método utilizado foi a transfecção pela coprecipitação do DNA com fosfato de cálcio. Para tanto, foi permitido que as células crescessem até atingirem a confluência de 80-90%. Posteriormente, as células foram coletadas utilizando EDTA a 0,02% em PBS, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para a concentração de 1×10^6 células/mL. As células foram cultivadas em placas de cultura de 12 poços. Após 24 horas, foi realizada a preparação da solução A – tampão HEPES duas vezes concentrado (50mM de HEPES, 280mM de NaCl, 1,5mM de Na₂HPO₄) e solução B – preparada adicionando aos poucos 1μg de DNA plasmidial (pVAX1-PB_HSP60 ou pVAX1 vazio) a 12,2μL solução de CaCl₂ a 2M, sendo o volume final foi acertado para 100μL com H₂O ultrapura. Após adicionar a solução B por gotejamento em 100μL de solução A, a solução foi deixada em repouso por 30 minutos. Aproximadamente 200μL de solução (AB) contendo o vetor plasmidial foi adicionada a cada poço da placa. O procedimento foi realizado em triplicata. Após 24 horas, as suspensões celulares foram lisadas com água destilada estéril congelada, a 4°C e centrifugadas a $10.000 \times g$, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi ressuspenso em tampão de amostra [Tris-HCl a 0,5M, pH 6,5, contendo SDS a 2,5% (m/v), 2-mercaptoetanol a 2,5% e glicerol a 10% (v/v)], incubadas em banho maria a 95°C, por 3 minutos, e submetido à eletroforese em gel de poliacrilaminada a 12% em condições dissociantes (SDS-PAGE a 12%).

3.4.2. Produção de anticorpos contra PbHsp60

Para produção de anticorpos, foram imunizados 4 camundongos C57BL/6 com a construção pVAX1-*PB_HSP60*, por via intramuscular, com três doses, em intervalo de 7 dias entre cada uma. Sete dias após a última imunização, o soro dos animais foi coletado e armazenado a -20°C. O soro desses animais foi utilizado como anticorpo primário no experimento de *Western blot*. Como controle negativo foi utilizado o soro dos animais imunizados somente com o vazio, pVAX1, e o soro pré-imune dos animais que receberam a imunização com o vetor pVAX1-*PB_HSP60*. Como controle positivo foi utilizado o soro de animais imunizados com PbHsp60r.

3.4.3. Indução e purificação de PbHsp60r

Bactérias *E. coli* da linhagem BL21 Rosetta foram transformadas com o plasmídeo pET-28a contendo o gene *PB_HSP60* (pET28a-*PB_HSP60*), conforme descrito para o pVAX1-*PB_HSP60*, no item 3.1.5. Para a expressão heteróloga, uma colônia da cepa acima foi inoculada em 10mL de caldo LB com canamicina (50µg/mL), a 37°C, de 14 a 16 horas, sob agitação constante (180rpm). Após este período, 200µL foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 2L do mesmo meio seletivo acima citado. Posteriormente, os frascos foram incubados a 37°C, sob agitação constante (180rpm). Quando as culturas atingiram uma absorbância a 600nm entre 0,5 e 0,6, adicionou-se a elas IPTG na concentração de 1mM. Foi permitida a expressão por 8 horas, em seguida as culturas foram coletadas em tubos de polipropileno de 50mL, por centrifugação por centrifugação a $7.000 \times g$, a 4°C, por 10 minutos. Os sedimentos bacterianos obtidos foram pesados, lavados com PBS por centrifugação a $7.000 \times g$, a 4°C, por 10 minutos, ressuspensos para uma concentração de 40% (m/v) em tampão de lise (NaH₂PO₄ a 50mM, NaCl a 300mM Triton X-100 a 1% (v/v) e 2-mercaptoetanol a 2mM) e sonicados a 200W, em banho de gelo, com 6 pulsos de 30 segundos cada. As amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$, à temperatura ambiente, por 10 minutos, os sobrenadantes descartados e os sedimentos, contendo corpúsculos de inclusão, lavados cinco vezes, por centrifugação, com solução de NaH₂PO₄ a 50mM e NaCl a 300mM contendo Triton X-100 a 1% (v/v), 2-mercaptoetanol a 2mM e ureia a 2M, pH 8.0. O sedimento foi, então, ressuspenso em tampão de desnaturação, contendo NaH₂PO₄ a 50mM, NaCl a 300mM e ureia a 7M, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após 2 horas, foi adicionado L-arginina a 2mM e incubado por mais 1 hora, à temperatura ambiente. Essa preparação foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences). A fim de se

eliminar endotoxinas, CIP (*clean-in-place*) com hidróxido de sódio a 1M foi realizado previamente e posteriormente a toda corrida em todo o sistema de purificação. O material não adsorvido à coluna foi retirado com o tampão de lise contendo 20mM de imidazol e 7M de ureia (20 volumes de coluna). O material adsorvido foi eluído com o mesmo tampão contendo 300mM de imidazol. As proteínas recombinantes purificadas foram analisadas por SDS-PAGE a 12%.

3.4.4. SDS-PAGE e Western blotting

As proteínas recombinantes purificadas e lisados de células HEK293T com ou sem transfecção foram separadas por SDS-PAGE a 12%, em sistema *Mini Protean Tetra* (Bio-Rad). A corrida foi realizada com tampão Tris a 24,8mM contendo glicina a 192mM e SDS a 0,1% (m/v). As corridas eletroforéticas tiveram duração de 1 hora, a 200V, sendo os géis corados com azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Como padrão de migração das proteínas foram usadas proteínas com massas moleculares conhecidas (MM), sendo eles provenientes do *LMW-Marker kit* [fosforilase b (97kDa), albumina sérica bovina (66kDa), albumina de ovo de galinha (45kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina (20,1kDa), α -lactoalbumina (14,4kDa), GE Healthcare Life Sciences].

As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas do gel de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences). A transferência foi realizada por 2 horas, a 150V, utilizando-se tampão de transferência (1,9% de Tris, 9% glicina e 10% de metanol). A seguir, a membrana foi corada por Ponceau S (0,5g de Ponceau, 2,5mL de ácido acético para 250mL de água), por 3 minutos, a fim de observar as bandas transferidas e a eficiência do procedimento. O excesso do corante foi removido por lavagens da membrana com água ultrapura. As membranas contendo as bandas foram recortadas e incubadas com tampão de bloqueio [leite desnatado a 5% em solução salina tamponada com Tris-HCl a 20mM, pH 7,6 (TBS) acrescida de Tween-20 a 0,05% (TBST)], a 4°C. Após 16 horas, as membranas foram lavadas 5 vezes com TBST, 5 minutos cada lavagem. Após a última lavagem, as membranas foram incubadas com um dos seguintes antissoros: soro policlonal contra PbHsp60r, gentilmente cedido pelo Dr. Fabrício F. Fernandes, soro dos animais imunizados com o vetor pVAX1-PB_HSP60, soro pré-imune, e soro de animais imunizados com o vetor pVAX1. Os soros foram diluídos 1:1.000 em TBST contendo gelatina a 1%. As membranas foram mantidas sob agitação constante, à temperatura ambiente. Após 4 horas, as membranas foram lavadas, como descrito acima, e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário – anticorpo de coelho

contra IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído 1:5.000 em TBST contendo gelatina a 1%, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após lavagens das membranas, as reações foram reveladas durante 5 minutos no escuro com o substrato 3'3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich). Ao final, as membranas foram lavadas em água destilada para interromper a reação, e colocadas para secar, à temperatura ambiente.

3.5. Protocolo de infecção e terapia de PCM experimental em camundongos

3.5.1. Protocolo experimental da infecção e tratamentos

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de 100µL de uma mistura em partes iguais de cetamina e xilazina (Syntec-Santana do Parnaíba), nas doses de 100 e 8 mg/kg de massa corpórea. Por meio de uma incisão longitudinal na região cérico-ventral de aproximadamente 1cm foi realizada a exposição da traqueia. Com o auxílio de uma seringa contendo uma agulha hipodérmica, injetou-se na traqueia 100µL de uma suspensão contendo 3×10^6 leveduras de *P. brasiliensis*/mL. Em seguida, foi realizada a sutura com auxílio de fio cirúrgico (Shalon, São Luís de Montes Belos, Brasil) e a antisepsia do local com PVPI (polivinilpirrolidona-iodo). Posteriormente, os animais foram colocados de volta na caixa com maravalha e observados até plena recuperação do procedimento cirúrgico. Após 21 dias de infecção, os animais foram divididos ao acaso em 5 grupos contendo oito camundongos, correspondentes aos grupos tratados com (1) PBS, (2) 100 µg do plasmídeo pVAX1 (vetor vazio), (3) 100 µg do plasmídeo pVAX1-PB_HSP60, (4) 100 µg do plasmídeo pVAX1-ML_HSP65 e (5) uma solução contendo 50 µg/mL de PbHsp60r. pVAX1-ML_HSP65 corresponde a uma vacina de DNA gênica contendo o gene da Hsp65 de *Mycobacterium leprae* (Santos Junior et al., 2007) e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Célio Lopes Silva do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP.

Cada animal recebeu 100µL de um dos tratamentos por via intramuscular. O tratamento foi realizado de duas maneiras: (1) com uma dose, após 21 dias de infecção ou (2) com três doses, com intervalos de 15 dias entre cada dose. Os animais foram submetidos à eutanásia 30 dias após a última intervenção. Os dois protocolos foram repetidos 3 vezes.

Para o experimento de sobrevivência, a rota de infecção utilizada foi a intranasal. Brevemente, 30 animais foram anestesiados conforme descrito acima e foram submetidos a inalação de uma suspensão de $3,0 \times 10^9$ leveduras/mL, através da transferência de 10µL da suspensão para a cavidade nasal com auxílio de uma pipeta. Após 21 dias os animais foram separados em três grupos e receberam um dos seguintes tratamentos: PBS (controle), 100µg do

plasmídeo pVAX1 ou 100µg de pVAX1-PB_HSP60. Os animais receberam três doses, com intervalos de 15 dias entre cada dose, após 30 dias os animais submetidos à eutanásia.

3.5.2. Determinação da carga fúngica

Fragmentos de pulmão dos animais foram adicionados a tubos contendo 1mL de PBS estéril, em seguida, esses fragmentos foram macerados no homogeneizador de tecidos (Ultra-Turrax IKA T25 Digital, Wilmington, EUA). Para se determinar a recuperação de fungos, 100µL do macerado de pulmão foram semeados, em duplicata, em placas de Petri contendo meio BHI-água enriquecido com 4% de soro fetal bovino inativado (Thermo Fisher Scientific) e 100µg/mL de ampicilina (Cellofarm Ltda, Serra, Brasil). As placas foram mantidas em estufa, a 36°C, e a recuperação de fungos viáveis nos órgãos foi avaliada a partir da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após 7 dias de cultivo. Os resultados foram expressos em UFC/g de tecido.

3.5.3. Análise histopatológica

Fragmentos de pulmão de camundongos utilizados neste experimento foram fixados em formalina a 10% tamponada com PBS, por 24 horas. A desidratação dos tecidos foi realizada gradualmente com etanol nas concentrações de 50, 70, 80, 90 e 100%. Em seguida, os tecidos foram diafanizados com Xilol, embebidos em parafina e os cortes histológicos foram seccionados com 5µm de espessura. Os cortes foram colocados em banho maria a 40°C e foram adicionados sobre a superfície de lâminas de microscopia previamente revestidas com albumina. Os cortes foram fixados a 30°C, por 24 horas, e submetidos à desparafinização em xilol e a reidratação de maneira gradual com etanol nas concentrações de 100, 90, 80, 70 e 50% e por fim água destilada. Após a hidratação, os cortes foram corados com os corantes hematoxilina-eosina (HE), e tricrômico de Gomori. As análises histológicas foram feitas com microscópio óptico (Zeiss Axiophot Microscope – Zeiss, Jena, Alemanha) e as imagens adquiridas com auxílio do programa Image Pro pela câmera digital AxioCam MRc (Zeiss) acoplada ao microscópio. Com o objetivo de avaliar e quantificar a área da lesão nos tecidos, as imagens adquiridas foram analisadas com auxílio do programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

3.5.4. Análise do perfil de citocinas

A dosagem das citocinas presente no sobrenadante dos macerados de pulmões foram realizadas por citometria de fluxo, utilizando-se o kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse

Th1/Th2/Th17 Cytokine (BD Biosciences, San Jose, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.6. Análise da atividade de PbHsp60r

3.6.1. Preparo de culturas celulares

Camundongos das linhagens BALB/c foram imunizados 3 vezes com 100µg *pVAX1-PB_HSP60* em intervalo de 15 dias entre as imunizações. Um grupo controle não foi imunizado. Os animais foram anestesiados como descrito anteriormente e mortos por deslocamento cervical. Os baços foram removidos assepticamente e divulsionados para a obtenção das células utilizadas nos diferentes ensaios. Dentre os animais não imunizados, foram utilizados também camundongos C57BL/6, TLR4-KO, TLR3-KO e TRIF-KO. As células esplênicas foram lavadas com 5mL de meio RPMI 1640 (Life Technologies) incompleto, por centrifugação a $250 \times g$, por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, as células foram ressuspensas em 5mL de tampão de lise ACK (150mM de NH_4Cl , 10mM de KHCO_3 e 1mM de EDTA, pH 7,3) e incubadas em banho de gelo, por 5 minutos. Posteriormente, 10mL de PBS estéril foram adicionados às células, que foram submetidas novamente à centrifugação a $250 \times g$, por 10 minutos, a 4°C, e ressuspensas em RPMI 1640 completo [suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF – Life Technologies), 100U/mL de penicilina (Life Technologies) e 100µg/mL de estreptomicina (Life Technologies)]. As células foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas para 1×10^6 células/mL. A quantidade de 100µL da suspensão celular foi distribuída em triplicata em poços de placas de 96 poços (Corning) e cultivadas na ausência ou presença dos estímulos: ConA (Sigma-Aldrich), PbHsp60r ou ConA + PbHsp60, em diferentes tempos, a 37°C, em estufa com ar umidificado contendo 5% de CO_2 . Foram usadas as concentrações de 2µg/mL para ConA e 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100µg/mL para PbHsp60r a depender do experimento.

Em algumas situações, as preparações de PbHsp60r foram usadas como estímulo na presença de polimixina B (PMX) (Sigma-Aldrich) a 30µg/mL. Para isso, uma solução estéril de PMX foi diluída em meio RPMI completo em conjunto com a proteína PbHsp60r; após 30 minutos a solução foi transferida para os poços contendo as culturas de células esplênicas totais nas concentrações desejadas. Em outras culturas, utilizou-se a proteína recombinante previamente aquecida a 95°C, por 30 minutos, ou pbHsp60r digerida com proteinase K (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. Após 4h de digestão, a amostra foi aquecida a 95°C por 30 minutos para inativação da enzima.

Para avaliar a atividade de PbHsp60r sobre células esplênicas aderentes e não aderentes, preparou-se a cultura celular conforme descrito acima. Após 2 horas de incubação, as células não aderentes foram separadas em uma outra placa. Células aderentes e não aderentes foram lavadas com 1mL PBS estéril e cultivadas novamente com RPMI 1640 completo, adicionando-se ou não o estímulo PbHsp60r em diversas concentrações a depender do experimento. Essas culturas foram incubadas por tempos diferentes entre cada experimento e posteriormente foram marcadas ou não com anticorpos contendo fluorocromos.

3.6.2. Citometria de fluxo

A caracterização dos tipos celulares presentes nas culturas foi realizada com os anticorpos anti-CD3 PE, anti-CD19 APC, anti-CD4 PE-Cy5 e anti-CD8 PE-Cy5.5 (BD Biosciences, Franklin Lakes, EUA). As células marcadas com anticorpos foram previamente incubadas com 0,5µg de anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de Fcγ, por 45 minutos a 4°C (Fc block, BD Biosciences). Em seguida, foram adicionados 0,5µg de anticorpos monoclonais conjugados aos fluorocromos, especificados acima, para 1×10^6 células, por 30 minutos, a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com 2mL de PBS estéril e adquiridas em um citômetro FACSCanto II (BD Biosciences). As análises foram realizadas no programa FlowJo 8.7.

3.7. **Análise estatística**

Os dados estatísticos das diferenças entre as médias dos grupos experimentais foram obtidos por análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4. RESULTADOS

4.1. Construção do plasmídeo vacinal pVAX1-PB_HSP60

Para a subclonagem do gene completo da PbHsp60 no vetor de expressão em células de mamífero, primeiramente, amplificou-se o gene *PB_HSP60* clonado no vetor pET28a, utilizando-se um iniciador direto contendo nucleotídeos correspondentes ao sítio de clivagem da enzima *EcoRI* e à sequência de Kozak (região 5') e ao sítio de clivagem da enzima *HindIII* e à sequências do códon de parada no iniciador reverso (região 3'). Os *amplicons* produzidos apresentaram tamanho condizente com o número de pares de base do gene completo da PbHsp60, ou seja, 1.788pb (Figura 1-A). Os *amplicons* foram purificados do gel e reunidos em um *pool*. Após digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* e análise em gel de agarose (dados não mostrados), o *amplicon* foi utilizado em uma reação de ligação com o vetor pVAX1, previamente digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. Após a ligação e transformação de bactérias eletrocompetentes, os clones que cresceram no meio seletivo foram selecionados por PCR. Apenas dois clones amplificaram o gene da PbHsp60 (Figura 1-B). Ao serem digeridas com *HindIII* e *EcoRI* para liberação do inserto, as construções obtidas desses clones mostraram duas bandas com aproximadamente 3.000 e 1.800pb, o que é condizente com o tamanho do plasmídeo e inserto, respectivamente (figura 1-C).

Foram enviadas para o sequenciamento as amostras de plasmídeos que tiveram o gene amplificado por PCR e liberaram o inserto após digestão com enzimas de restrição enzimática *HindIII* e *EcoRI*. A análise dos dados do sequenciamento permitiu identificação da inserção das sequencias necessárias para a expressão do vetor de mamíferos (dados não mostrados).

Figura 1: Análise do gene *PB_HSP60* e da construção *pVAX1-PB_HSP60* por eletroforese em gel de agarose. (A) O gene *PbHSP60* foi amplificado em oito reações diferentes, sendo a análise feita a partir de 3µL de cada reação. (B) *Bactérias E. coli* DH10b foram transformadas com a ligação do inserto contendo o gene da *PbHsp60* ao *pVAX1* e cultivada em ágar LB. Colônias que cresceram no meio seletivo contendo canamicina foram selecionadas e submetidas à PCR para a amplificação do gene da *PbHsp60*. (C) Plasmídeo do clone 1 foi purificado e digerido com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI*. M = marcador; os tamanhos moleculares, em pb, de fragmentos de DNA usados como marcadores estão indicados à esquerda da figura. Clone 1 e 2 = clone positivo para amplificação do gene da *Hsp60*. Ctrl + = controle positivo da PCR. As análises foram feitas em eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Os géis foram incubados previamente com SYBR-Safe e analisados em transiluminador de luz azul.

4.2. A construção *pVAX1-PB_HSP60* expressa *PbHsp60* em células eucarióticas transfectadas e quando usada para imunizar camundongos induz produção de anticorpos

Para demonstrar que a dose de 100µg da construção *pVAX1-PB_HSP60* seria capaz de gerar uma resposta imunológica antígeno específica em camundongos, imunizou-se animais com a construção, seguindo-se dois reforços. Quando os *pools de* soros foram analisados por *Western blot*, foi possível observar que o *pool* de soros de camundongos imunizados com *pVAX1-PB_HSP60*, assim como dos animais imunizados com *PbHsp60r*, apresentava forte reatividade com *PbHsp60r* (Figura 2). Como esperado, soro pré-imune e de animais imunizados com o vetor vazio não geraram anticorpos contra a *PbHsp60r*.

Figura 2: Camundongos imunizados com pVAX1-PB_HSP60 geram resposta imunológica específica para PbHsp60r. Amostras de PbHsp60r foram separadas SDS-PAGE a 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose. Soro de camundongos imunizados com (1) PbHsp60r, (2) pVAX1-PB_HSP60, (3) soro pré-imune de animais vacinados com pVAX1-PB_HSP60, ou (4) vetor vazio (pVAX1 sem o inserto) foram usados para detecção da PbHsp60r, por *Western blot*. Todos os soros foram diluídos 1:1.000 em PBS-T. As reações antígeno anticorpo foram reveladas com o uso de anticorpo de coelho contra IgG de camundongo conjugado à peroxidase, peróxido de hidrogênio e DAB.

Antes de realizar os experimentos *in vivo* de tratamento, analisou-se a expressão da PbHsp60 em células de mamífero transfectadas com pVAX1-PB_HSP60. As análises por *Western blot* de lisados de células HEK293 transfectadas com a construção pVAX1-PB_HSP60 revelaram expressão de PbHsp60 com a massa molecular esperada (Figura 3). Quando comparada com a proteína recombinante heteróloga produzida em bactéria, observou-se uma massa molecular menor da proteína expressa em células HEK293, o que pode ser explicado pela presença de muitos aminoácidos adicionais na recombinante bacteriana. Essas adições, não encontradas na construção pVAX1-PB_HSP60, são referentes aos nucleotídeos do vetor na região do *polilinker*, bem como da sequência de seis histidinas. O controle negativo, células transfectadas com o vetor vazio, não revelou nenhuma banda, o que é condizente com a ausência da PbHsp60.

Figura 3: Células HEK293 transfectadas com pVAX1-PB_HSP60 expressam PbHsp60. Células HEK293 foram transfectadas com pVAX1-PB_HSP60 ou vetor vazio (pVAX1), por 24 horas. Lisados dessas células foram submetidos a SDS-PAGE a 12%, sendo as proteínas transferidas do gel para membrana de nitrocelulose. PbHsp60r foi usado como controle positivo. A detecção das proteínas foi feita com anticorpos policlonais de camundongo contra PbHsp60r. As reações antígeno anticorpo foram reveladas como descrito na legenda da figura anterior.

4.3. Camundongos infectados e tratados com três doses de pVAX1-PB_HSP60 apresentam melhora do quadro infeccioso

Dados prévios de nosso grupo mostraram que a administração de 25 ou 50µg de PbHsp60r emulsificada em adjuvante completo de Freund (CFA), em dose única, em animais infectados há 21 dias com *P. brasiliensis*, induzia um aumento de carga fúngica e de lesão pulmonar quando comparado a animais não tratados ou tratados apenas com CFA (FERNANDES, F. F. et al., 2016). Para determinar se a forma de apresentação do antígeno ao sistema poderia alterar o resultado encontrado, testou-se a construção pVAX1-PB_HSP60 por injeção intramuscular, cuja proteína seria produzida nos tecidos do animal.

O tratamento de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* com uma dose de pVAX1-PB_HSP60 não promoveu uma diferença significativa na carga fúngica nos pulmões desses animais quando comparado aos animais tratados com pVAX1-ML-HSP65, vetor vazio ou PBS. Em concordância com resultados prévios, PbHsp60r promoveu um aumento significativo da carga fúngica dos animais infectados – três vezes superior – quando comparado aos demais grupos (Figura 4).

Figura 4: O tratamento de camundongos infectados com *P. brasiliensis* com uma dose de pVAX1-*PB_HSP60*, ao contrário de PbHsp60r, não induz redução da carga fúngica nos pulmões desses animais em relação aos controles. Camundongos BALB/c foram infectados via i.t. com 3×10^5 leveduras Pb18 de *P. brasiliensis*. Vinte um dias após a infecção, os animais foram divididos em 5 grupos de 8 animais e foram tratados com pVAX1-*PB_HSP60*, pVAX1-*ML_HSP65*, vetor vazio (pVAX1), PbHsp60r ou PBS (controle da infecção). Os animais foram submetidos à eutanásia 30 dias após o tratamento. Fragmentos de pulmão foram removidos e homogeneizados para análise da quantidade de UFC. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão das UFC/g de tecido. Asterisco indica $p < 0,05$ em relação aos demais grupos.

Além de não ter alterado carga fúngica em relação aos controles, o tratamento com pVAX1-*PB_HSP60* não produziu o efeito deletério observado ao tratar-se os animais com a PbHsp60r (Figura 5). De fato, o tratamento com uma dose de pVAX1-*PB_HSP60* não produziu alteração no quadro inflamatório quando comparado aos grupos controle injetados com PBS, plasmídeo vazio ou pVAX1-*ML_HSP65*. Nesses grupos, na maioria dos pulmões havia granulomas não muito bem formados, com muitas leveduras no seu interior e com grande de área com inflamação difusa. No grupo tratado com PbHsp60r haviam granulomas grandes, confluentes e repletos de leveduras (Figura 5).

Figura 5. Tratamento de camundongos infectados com *P. brasiliensis* com uma dose de pVAX1-PB_HSP60 não induz alteração do quadro inflamatório. Animais foram infectados e tratados como descrito na legenda da figura anterior. Os pulmões removidos foram processados para análise histológica. A-E são cortes corados com hematoxilina-eosina e F-J corados com tricrômico de Gomori: A e F- PBS, B e G - pVAX1, C e H - pVAX1-ML_HSP65, D e I - pVAX1-PB_HSP60, E e J - PbHsp60r. Barra=200µm.

Embora a concentração da maioria das citocinas dos macerados de pulmões não tenha se alterado significativamente entre os grupos, foi interessante notar que a PbHsp60r induziu o

aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatória IL-6 e IL-17 e anti-inflamatória IL-10 (Figura 4) quando comparado aos demais grupos.

Figura 6: Diferente de PbHsp60r, cujo tratamento aumentou citocinas IL-6, IL-17 e IL-10, uma dose das vacinas de DNA não teve efeito significativo na concentração das citocinas em relação aos controles. Animais foram infectados e tratados como descrito na legenda da figura 4. Citocinas foram dosadas a partir do sobrenadante do macerado de pulmão desses animais. Asterisco indica $p < 0,05$ em relação aos animais tratados com PBS.

A discrepância dos resultados obtidos entre os animais tratados com pVAX1-*PB_HSP60* daqueles tratados com proteína, bem como a descrição de que uso de quatro doses de pVAX1-*ML_HSP65* tinha um efeito benéfico no tratamento de PCM experimental (RIBEIRO et al., 2010), motivou-nos a testar se o tratamento com três doses das preparações poderia acarretar em algum benefício para os animais durante a PCM experimental. Conforme

pode ser visto na figura 7, o tratamento dos animais infectados com três doses de pVAX1-*PB_HSP60*, pVAX1-*ML_HSP65* ou PbHsp60r reduziu a carga fúngica pulmonar quando comparado aos números de UFC obtidos de animais controle que foram infectados e tratados com pVAX1 ou PBS.

Figura 7: O tratamento de camundongos infectados com *P. brasiliensis* com três doses de pVAX1-*PB_HSP60* induz redução da carga fúngica pulmonar. Camundongos BALB/c foram infectados como descrito na figura 4. Após 21 dias de infecção, os animais foram divididos em 5 grupos (n=8) e foram tratados com três doses de PBS (controle da infecção), pVAX1 (vetor vazio, controle do efeito do plasmídeo), pVAX1-*ML_HSP65*, pVAX1-*PB_HSP60* ou PbHsp60r. O intervalo entre cada tratamento foi de 15 dias entre cada dose. Os animais foram submetidos à eutanásia 30 dias após o último tratamento e fragmentos do pulmão foram removidos e homogeneizados para análise da quantidade de UFC. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão das UFC/g de tecido. Asterisco indica $p < 0,05$ em relação aos grupos controles PBS e pVAX1.

A análise dos cortes histológicos dos grupos que receberam três doses de pVAX1-*PB_HSP60*, pVAX1-*ML_HSP65* ou PbHsp60r demonstrou a presença de granulomas compactos. Essas estruturas apresentavam leveduras em seu interior e a presença de colágeno, determinado pelo método da coloração pelo tricrômico de Gomori, diferente dos grupos controles que receberam PBS ou pVAX1, que apresentaram granulomas mal delimitados com grande quantidade de leveduras no seu interior (Figura 8). De modo interessante, os animais que receberam três doses de PbHsp60r apresentaram uma melhora considerável quando comparada com os animais que receberam apenas uma dose de PbHsp60r e com o grupo controle que recebeu apenas PBS (Figura 10), demonstrando que três doses foram necessárias

para geração de uma resposta imunológica mais adequada para o controle da PCM experimental.

Figura 8: Tratamento com três doses de pVAX1-PB_HSP60, pVAX1-ML_HSP65 ou PbHsp60r induz melhora na PCM experimental. Camundongos infectados e tratados como descrito na figura 7. Os pulmões removidos foram processados para análise histológica. A-E são cortes corados com hematoxilina-eosina e F-J corados com tricrômico de Gomori: A e F- PBS, B e G - pVAX1, C e H - pVAX1-ML_HSP65, D e I - pVAX1-PB_HSP60, E e J - PbHsp60r. Barra=200µm.

A redução da carga fúngica observada nos animais tratados com pVAX1-PB_HSP60, pVAX1-ML_HSP65 ou PbHsp60r foi acompanhada de uma mudança da resposta imunológica, com um aumento significativo na concentração de IFN- γ , TNF e diminuição de IL-10 nos pulmões quando comparado aos animais dos grupos controles. Além dessas citocinas, houve aumento da concentração de IL-6 e IL-17 pulmonar em animais tratados com pVAX1-

PB_HSP60, *pVAX1-ML_HSP65* quando comparado aos animais dos grupos controles (Figura 9).

Figura 9: Perfil de citocinas de animais tratados após 21 dias de infecção com três doses de *pVAX1-PB_HSP60*, *pVAX1-ML_HSP65*, *PbHsp60r*, *pVAX1* ou *PBS*. Animais foram infectados e tratados como descrito na legenda da figura 7. Citocinas foram dosadas a partir do sobrenadante do macerado de pulmão desses animais. Asterisco indica $p < 0,05$ em relação aos animais tratados com *PBS* e *pVAX1*.

A análise morfológica dos cortes histológicos demonstrou que os animais tratados com apenas uma dose tanto de *pVAX1-PB_HSP60* ou de *pVAX1-ML_HSP65* não mostraram nenhuma redução da área de lesão quando comparado com os controles negativos, grupos que receberam *PBS* ou *pVAX1*. O tratamento com uma dose de *PbHsp60r* induziu um aumento da área de lesão quando comparado com os animais tratados com *PBS* (Figura 10), condizente com os resultados de número de UFC de cada um desses grupos (Figura 4).

Já o tratamento dos animais com três doses de pVAX1-PB_HSP60, pVAX1-ML_HSP65 ou PbHsp60r induziu uma diminuição da área de lesão quando comparados com os animais tratados com PBS e pVAX1. Curiosamente, os animais tratados com três doses de proteína recombinante foram opostos ao obtidos com uma dose, embora, ainda tenha ocorrido áreas com focos de inflamação maiores que os grupos tratados com pVAX1-PB_HSP60 (Figura 10).

Figura 10: Tratamento de animais infectados com três doses de pVAX1-PB_HSP60, mas não com uma dose, induz diminuição de lesão pulmonar. Imagens de cortes histológicos de animais infectados e tratados com três doses ou uma dose foram usadas para quantificar a área da lesão nos tecidos. As imagens adquiridas foram analisadas com auxílio do programa ImageJ. Asterisco indica $p < 0,05$ em relação aos animais tratados com PBS e pVAX1.

Em virtude de os plasmídeos terem sido produzidos em larga escala em bactérias Gram negativas, *E. coli* DH10b, poderia-se aventar que os efeitos observados ocorreram, ao menos em parte, em decorrência de contaminação das plasmídeos purificados com LPS, muito embora tais efeitos não foram observados com o plasmídeo vazio (pVAX1), cujo procedimento de purificação foi idêntico ao descrito para pVAX1-PB_HSP60. Para confirmar que o efeito fora da construção pVAX1-PB_HSP60 e não devido a uma contaminação com LPS na amostra, foram refeitos os experimentos com animais deficientes para o gene de TLR4, PRR cujo agonista é o LPS. Conforme mostrado na figura 11, as respostas aos tratamentos não se alteraram com a ausência de TLR4, ou seja, o tratamento pVAX1-PB_HSP60, mas não pVAX1

vazio, diminuem a carga fúngica dos animais infectados quando comparado aos animais controle tratados com PBS.

Figura 11: A diminuição de carga fúngica em animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com pVAX1-*PB_HSP60* não é dependente TLR4 e, conseqüentemente, de seus agonistas. Camundongos TLR4-KO foram infectados como descrito na figura 4. Vinte um dias após a infecção, os animais foram divididos em 5 grupos (n=5) e foram tratados com três doses de PBS (controle da infecção), pVAX1 (vetor vazio, controle do efeito do plasmídeo) ou pVAX1-*PB_HSP60*. O intervalo entre cada tratamento foi de 15 dias entre cada dose. Os animais foram submetidos à eutanásia 30 dias após o último tratamento e fragmentos do pulmão foram removidos e homogeneizados para análise da quantidade de UFC. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão das UFC/g de tecido. Asterisco indica $p < 0,05$ em relação aos demais grupos.

O fato dos animais terem tido uma melhora permitiu aventar a hipótese que a construção pVAX1-*PB_HSP60* diminuiria a taxa de mortalidade de animais infectados com uma concentração maior de fungos. De fato, nenhum dos animais tratados com pVAX1-*PB_HSP60* morreu até 100 dias após infecção, enquanto que todos os animais tratados com PBS e pVAX1 estavam mortos por volta dos 90 dias pós-infecção (Figura 12).

Figura 12: Tratamento com pVAX1-PB_HSP60 impede que animais infectados sucumbam a infecção. Animais foram infectados por via intranasal com 10 μ L de uma suspensão de $3,0 \times 10^9$ leveduras Pb18/mL. Após 21 dias, os animais foram divididos em três grupos de 10 animais. Os animais foram tratados com três doses de pVAX1-PB_HSP60, pVAX1 ou PBS, com intervalo de 15 dias entre cada imunização. A mortalidade cumulativa foi acompanhada diariamente em todos os grupos experimentais por 100 dias de infecção.

4.4. PbHsp60r impede a proliferação de células esplênicas de animais *naïve* ou animais imunizados com pVAX1-PB_HSP60

Resultados prévios de nosso grupo mostraram que PbHsp60r não estimula *in vitro* células esplênicas de animais imunizados ou não com uma dose de PbHsp60r. Além disso, foi observado uma redução no número de células. Essa diminuição do número de células foi determinada por citometria de fluxo, através da análise de tamanho e granularidade (Fernandes, 2013). Para avaliar o mecanismo envolvido nessa diminuição, utilizou-se aqui a determinação de viabilidade das células pela redução do sal de tetrazólio (MTT) em formazan. Como observado anteriormente para células de animais imunizados com uma dose de PbHsp60r, células esplênicas de animais imunizados com três doses de pVAX1-PB_HSP60 não proliferaram quando estimuladas com a proteína recombinante, ao contrário, os resultados indicam que ocorre uma redução do número total de células quando a concentração de rHsp60 é aumentada (Figura 13). É importante notar que a mesma redução ocorreu com as células dos animais *naïves*

de forma dose dependente, não havendo, pois, diferença significativa entre o grupo dos animais que foram imunizados dos animais não imunizados.

Figura 13: Células esplênicas de animais imunizados com pVAX1-PB_HSP60 não proliferam após reestimulação com PbHsp60r. Cinco animais foram imunizados três vezes com pVAX1-PB_HSP60. Sete dias após a terceira imunização os animais foram mortos e tiveram as células do baço coletadas e estimuladas com diferentes concentrações de PbHsp60r. A percentagem de viabilidade foi obtida pela leitura de absorbância em 570nm do lisado celular, onde se acumula formazan como produto da redução de MTT.

Em função de não ter ocorrido a proliferação das células de modo antígeno-específico (experimento acima), investigou-se o que ocorre quando coestimula-se as células do baço de animais *naïve* com a PbHsp60r e concanavalina A (ConA), um mitógeno policlonal de linfócitos T. Como esperado, PbHsp60r reduziu em torno de 20% a viabilidade das células esplênicas de animais *naïve* em relação às células não estimuladas. Surpreendentemente, ConA não induziu seu potencial de indutor mitótico quando as células foram coestimuladas com PbHsp60r, havendo uma redução em torno de 60% em relação às células estimuladas apenas com ConA (Figura 14). Não houve diferença significativa de viabilidade entre células esplênicas sem estímulo e com estímulo policlonal quando incubadas com PbHsp60r.

Quando as células esplênicas foram separadas em aderentes e não aderentes, observou-se que a diminuição observada nas células totais apenas ocorria com a células não aderentes (dados não mostrados). Ao analisar as células esplênicas não aderentes estimuladas com

PbHsp60r por citometria de fluxo, evidenciou-se que ocorria diminuição de linfócitos T CD4 e CD8 e linfócitos B (Figura 15). De modo esperado, não houve alteração na quantidade de células aderentes CD11b estimuladas com PbHsp60r quando comparada com as células não estimuladas (dados não mostrados).

Figura 14: Células esplênicas de animais *naïve* não proliferam quando coestimuladas com PbHsp60r e ConA. Culturas de células esplênicas foram estimuladas por 48 horas com ConA em presença de PbHsp60r. Após o tempo de estimulação foi adicionado 7µL mTT nessas soluções. O mesmo experimento foi feito em uma cultura estimulada apenas com PbHsp60r. A percentagem de viabilidade foi obtida pela leitura de absorbância em 570nm do lisado celular, onde se acumula formazan como produto da redução de MTT. Células não estimuladas foram usadas como abscissa.

Figura 15: Caracterização das populações celulares sensíveis à estimulação com PbHsp60r Cultura de células esplênicas foram estimuladas por 24 horas com PbHsp60r. **1** – A-D: Células esplênicas totais foram plaqueadas e mantidas por 2 horas, a 37°C, para aderência. Após este tempo as células não aderentes foram transferidas para outros poços. Após transferências, as células foram estimuladas ou não com 50µg/mL de PbHsp60r, por 24 horas. A- Células aderentes não estimuladas com PbHsp60r, B- células não aderentes não estimuladas com PbHsp60r, C- células aderentes estimuladas com PbHsp60r, e D- células não aderentes estimuladas com PbHsp60r. **2** – Gráfico com análises estatísticas da redução de eventos após estímulo com 50µg/mL de PbHsp60r. O asterisco indica p<0,05 em relação ao grupo não estimulado. **3** – *Dot plot* representando culturas não estimuladas (A, C e E) e células estimuladas com 50µg/mL de PbHsp60r (B, D e F). Linfócitos T CD4 (A e B), linfócitos T CD8 (C e D) e linfócitos B (E e F).

Neste ponto do trabalho, passou-se a se investigar qual o mecanismo que estava levando à morte dessas células. Dados anteriores obtidos com células de animais deficientes da proteína adaptadora MyD88, que é importante para sinalização da maioria dos TLRs, mostraram que essa não é a via responsável pela diminuição do número de células induzida por PbHsp60r

(FERNANDES, F. F., 2013). O fato de TLR3 e TLR4 sinalizarem de um modo independente de MyD88, fez com que se testasse as vias dependentes da molécula adaptadora TRIF. De um modo muito interessante, verificou-se que a falta de TLR4 em células de camundongos TLR4-KO previne a diminuição das células esplênicas induzidas por PbHsp60r, o que não foi observado para células esplênicas de animais TLR3-KO (Figura 16). Devido aos resultados que mostraram a importância de TLR4 para a sinalização que induz diminuição no número de células e pelo fato de esse receptor sinalizar via MyD88 e TRIF, aventou-se a hipótese de que a via de TRIF deveria ser determinante para o fenômeno. Assim como aconteceu com as células de animais TLR4-KO, não houve diminuição das células esplênicas de animais TRIF-KO quando estimuladas *in vitro* com PbHsp60r (Figura 16).

Figura 16: A diminuição do número de células esplênicas estimuladas com PbHsp60r é dependente de TLR4 e TRIF. Cultura de células esplênicas de animais selvagens ou deficientes de TLR3 (TLR3-KO), TLR4 (TLR4-KO) ou TRIF (TRIF-KO) foram estimuladas por 24 horas com PbHsp60r. Após o tempo de estimulação, 7µL de uma solução de MTT a 5µg/mL foi adicionado à cultura. A percentagem de viabilidade foi obtida pela leitura de absorbância em 570nm do lisado celular, onde se acumula formazan como produto da redução de MTT. O asterisco indica $p < 0,05$ em relação ao grupo de camundongos selvagens (wt).

O fato de o fenômeno observado ser dependente de um receptor cujo agonista é o LPS, tornou compulsório que se testasse a possibilidade de contaminação, muito embora o processo de purificação da proteína recombinante tenha sido feito de modo a se excluir a presença de endotoxina. A estimulação das células esplênicas com PbHsp60r na presença de polimixina B a 30µg/mL, para a neutralização de LPS, não alterou significativamente o fenômeno de diminuição do número de células induzida por PbHsp60r, sugerindo que o LPS não era o responsável pela indução de morte das células (Figura 17-A). Para se demonstrar que os resultados observados foram ocasionados de fato pela PbHsp60r, as células esplênicas foram estimuladas com PbHsp60r digerida com proteinase K ou desnaturada por calor. Tanto a amostra contendo digesto de PbHsp60r quanto a proteína desnaturada por aquecimento não tiveram o mesmo efeito da PbHsp60r não tratada (Figura 17-B e -C).

Figura 17: Diminuição das células esplênicas ocorre em função da estimulação com PbHsp60r. Células esplênicas de animais *naïves* foram estimuladas com PbHsp60r, como descrito anteriormente. **A** – Células tratadas ou não concomitantemente com polimixina-B (PbHsp60r-PMX). **B** – Células estimuladas com 25µg/mL de PbHsp60r digerida ou não com proteinase K. Como controle, células foram estimuladas ou não com proteinase K sozinha. O asterisco indica $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. **C** – Concentrações diferentes de PbHsp60r foram aquecidas a 95°C, por 30 minutos, e posteriormente usadas para estimular células esplênicas. O asterisco indica $p < 0,05$ em relação às culturas estimuladas com PbHsp60r não desnaturada por aquecimento. A percentagem

de viabilidade foi obtida pela leitura de absorbância em 570nm do lisado celular, onde se acumula formazan como produto da redução de MTT.

No próximo passo, tentou-se descobrir se o que estava ocorrendo era a morte celular de um modo indireto, ou seja, PbHsp60r se liga ao receptor TLR4 que, por conseguinte, induz a secreção de algum fator que induz a morte celular. Dentre as moléculas que podem ser relacionadas com a via TLR-4/TRIF está o TNF, que agindo sobre o seu receptor levaria a morte celular por apoptose ou necroptose (FEOKTISTOVA et al., 2016). Para se avaliar o papel do TNF no fenômeno, coestimulou-se células esplênicas de animais *naïve* com PbHsp60r e anticorpos bloqueadores contra TNF. Utilizando a concentração de 1µg/mL foi possível observar um bloqueio da diminuição da viabilidade celular induzida por PbHsp60r (Figura 18). Com esse resultado foi possível sugerir que PbHsp60r induzia morte das células por um mecanismo indireto, dependente de TNF.

Figura 18. Morte de células esplênicas induzida por PbHsp60r ocorre por um mecanismo indireto dependente de TNF. Células esplênicas de animais *naïve* foram coestimuladas, por 24 horas, com 25 e 50µg/mL de PbHsp60r e anticorpos contra TNF, na concentração de 1µg/mL. A percentagem de viabilidade foi obtida pela leitura de absorbância em 570nm do lisado celular, onde se acumula formazan como produto da redução de MTT. O asterisco indica $p < 0,05$ em relação às células tratadas com os anticorpos controles (não relevantes).

Para reforçar tal sugestão, estimulou-se células esplênicas de animais deficientes do receptor 1 (TNFR1-KO) ou dos receptores 1 e 2 de TNF (TNFR1R2-KO) com PbHsp60r. Consistente com os experimentos de bloqueio da citocina TNF com anticorpos, não foi observada a diminuição das células esplênicas de animais TNFR1R2-KO e TNFR1-KO quando estimuladas com PbHsp60r (Figura 19). Os resultados acima sugerem que morte das células não ocorre pela ligação direta entre PbHsp60r e TLR-4. O que ocorre provavelmente é a morte por meio de TNF que atuaria no receptor TNFR1.

Figura 19: Morte de células esplênicas ocorre em função do receptor de TNFR1. Células esplênicas de animais *naïve* selvagens ou deficientes dos receptores 1 e 2 de TNF (TNFR1R2-KO) ou deficientes do receptor 1 de TNF (TNFR1-KO) foram estimuladas por 24 horas com concentrações diferentes de PbHsp60r. A percentagem de viabilidade foi obtida pela leitura de absorbância em 570nm do lisado celular, onde se acumula formazan como produto da redução de MTT. O asterisco indica $p < 0,05$ em relação às células esplênicas de animais selvagens estimuladas com PbHsp60r.

5. DISCUSSÃO

Nosso grupo vem pesquisado nos últimos anos o uso de moléculas com potencial terapêutico na infecção experimental por *P. brasiliensis* (COLTRI et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2008; FERNANDES, F. F. et al., 2016; LANDGRAF et al., 2017a). Em um desses estudos, ao se avaliar a PbHsp60r, em dose única, como uma molécula terapêutica na PCM experimental, observou-se um inesperado impacto negativo nos animais infectados, com aumento de carga fúngica e lesões pulmonares (FERNANDES, F. F. et al., 2016). Esse efeito revertia, inclusive, o efeito benéfico observado por De Oliveira et al. (2008), quando utilizaram terapêuticamente CFA na PCM experimental. Buscou-se, no presente estudo, avaliar se outra forma de entrega do antígeno PbHsp60 no processo de imunização poderia ter um efeito melhor do que a observada com a imunização com proteína recombinante. Optou-se por vacina gênica, desde que Ribeiro et al. (2010) obtiveram bons resultados com uma preparação do plasmídeo pVAX1 subclonado com o gene da Hsp65 de *M. leprae*. Com apenas uma única dose de pVAX1 subclonado com o gene da PbHsp60 ou pVAX1-*ML_HSP65* não foi possível induzir uma melhora no curso da infecção. Quando os animais foram tratados com três doses de pVAX1-*PB_HSP60* ou pVAX1-*ML_HSP65* ocorreu uma melhora significativa tanto na carga fúngica quanto nas lesões pulmonares quando comparado aos controles tratados com PBS ou vetor vazio. Em consonância com esse resultado, ressalta-se o papel protetor da preparação pVAX1-*PB_HSP60* utilizada em três doses, uma vez que protegeu todos os animais previamente infectados com dose letal de *P. brasiliensis* por até 100 dias. Por volta de 90 dias após a infecção, todos os animais dos grupos que receberam PBS e pVAX1 vazio já haviam morrido.

A melhora dos animais que receberam o tratamento com três doses da vacina gênica permitiu questionar se o mesmo poderia ocorrer com a proteína recombinante. Repetimos o experimento realizado com uma dose de PbHsp60r e obtivemos resultados semelhantes ao observados anteriormente por Fernandes et al. (2016), com um aumento da carga fúngica e da área de lesão quando comparados aos animais tratados apenas com PBS (FERNANDES, F. F. et al., 2016). Quando avaliou-se se três doses de PbHsp60r poderia levar a uma melhora do quadro da PCM experimental, observou-se uma redução da carga fúngica e diminuição de lesões pulmonares quando comparado aos controles tratados com PBS.

Um dos aspectos negativos do uso de vacinas de DNA é a sua baixa imunogenicidade quando comparada com outros sistemas de tratamento (HASSON; AL-BUSAIDI; SALLAM, 2015; TRIMBLE et al., 2009). No presente trabalho foi demonstrado que o tratamento com uma dose de plasmídeo vacinal contendo o inserto do gene da PbHsp60 não acarretou em redução no que concerne aos valores de UFC, citocinas e área de lesão. Talvez a maior

quantidade de antígeno administrada no grupo que recebeu uma dose de PbHsp60r seja responsável pela maior indução de inflamação e lesão. A variação no quadro infeccioso observado entre o tratamento com uma dose e três doses pode ser, ao menos em parte, devida ao aumento de IL-10 no pulmão, uma vez que essa citocina estava em concentrações significativas maiores nos macerados de pulmão de animais que tiveram um impacto negativo na infecção após serem tratados com uma dose de PbHsp60r quando comparado aos controles. Em contraste, IL-10 estava em concentrações menores nos macerados de pulmão de animais que se beneficiaram do tratamento com três doses de pVAX1-PB_HSP60, pVAX1-ML_HSP65 ou PbHsp60r em relação aos controles da infecção. Esses resultados estão de acordo com os obtidos previamente, onde mostrou-se que IL-10 e TGF- β pulmonares estão aumentadas nos animais tratados com uma dose de PbHsp60r (Fernandes et al., 2016). De fato, a citocina IL-10 em conjunto com TGF- β parece ser responsável pela evasão do fungo do sistema imunitário. Costa et al. (2013) demonstraram que macrófagos de animais deficientes para expressão IL-10 apresentaram um aumento da capacidade de fagocitose e morte das células do fungo. Além disso, foi observado uma maior capacidade de redução da carga fúngica no pulmão dos animais sem aumentar a área de lesão gerada pela inflamação. A presença da citocina TGF- β tem o papel de reparo tecidual, evitando uma resposta imunológica exacerbada contra o fungo (COSTA et al., 2013). Essa citocina atuando em conjunto com a IL-10 pode ser responsável pela diminuição da resposta do hospedeiro frente a infecção fúngica (FORTES et al., 2011). As duas citocinas são responsáveis pela supressão da resposta Th1 que seria necessária para eliminar o fungo do organismo.

Com os tratamentos utilizando-se três injeções das vacinas gênicas ou da proteína recombinante, houve um aumento na quantidade de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF. As preparações vacinais ainda aumentaram as concentrações pulmonares de IL-6 e IL-17. Assim, é possível observar que durante o tratamento havia uma tendência de indução de uma resposta de padrão misto Th1/Th17. O perfil Th1 já foi demonstrado induzir uma melhora devido a um aumento de NO e espécies reativas de oxigênio produzidos por fagócitos (CALVI et al., 2003; FORTES et al., 2011; KASHINO et al., 2000). A produção da IFN- γ tem um papel importante durante o curso da PCM. Cano et al. (1998) (CANO et al., 1998) demonstraram que o bloqueio de IFN- γ com anticorpo acarreta na piora da infecção da PCM em camundongos. Souto et al., utilizando animais deficientes de IFN- γ , demonstraram que os animais deficientes infectados morriam mais rapidamente do que os controles selvagens (SOUTO et al., 2000). É possível que a produção de IFN- γ estimule a produção de TNF que possui papel na formação de granulomas e na atração de células para o local da infecção

(HICKEY et al., 1997). Como citado anteriormente, as três doses das preparações induziram a redução da citocina IL-10, cujo efeito antagônico aos do TNF e IFN- γ nas respostas imunológicas é bem documentado (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008; MOORE et al., 2001). A redução da produção da IL-10 foi demonstrada como benéfica durante a PCM (COSTA et al., 2013).

No presente trabalho tentou-se descobrir o mecanismo pelo qual PbHsp60r estimularia o sistema imunológico. Para isso, imunizamos três vezes os camundongos com a construção pVAX1-PB_HSP60 e reestimulamos *in vitro* as células esplênicas desses animais com a proteína recombinante. Ao contrário do esperado, não houve proliferação dessas células. O mesmo evento ocorreu quando a cultura de células esplênicas utilizada era proveniente de animais *naïve*, sendo utilizado o estímulo policlonal com ConA. Em ambos experimentos ocorreu a redução da viabilidade das células após estímulo com PbHsp60r.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a produção de óxido nítrico é responsável pela diminuição da proliferação de linfócitos. Souto e colaboradores demonstraram que células esplênicas de animais infectados com *P. brasiliensis* apresentavam uma menor proliferação quando estimulados com ConA em comparação às células estimuladas de animais não infectados. Curiosamente, essa supressão de proliferação celular induzida por ConA não foi observada em células esplênicas de animais deficientes de IFN- γ (GKO) ou do TNFR1, que apresentavam uma expressiva produção de NO. Quando as culturas de células esplênicas de animais GKO infectados com *P. brasiliensis* foram estimuladas com ConA e suplementadas com IFN- γ , houve uma redução significativa da proliferação celular e aumento bastante significativo de NO. Quando a enzima iNOS foi inibida *in vitro* por LNMMA, as culturas onde teoricamente haveria supressão de proliferação celular passaram a ter proliferação celular (SOUTO et al., 2000). Em outro trabalho, foi demonstrado que células esplênicas de animais infectados proliferavam mais quando os animais eram tratados com o inibidor N-nitro-L-arginina (BOCCA, A. L. et al., 1998). Dessa forma, possivelmente a produção de NO seria um fator que poderia levar a uma diminuição da proliferação dos linfócitos. No presente estudo, não foram encontradas concentrações de nitrito com diferença significativa dos controles quando células esplênicas foram tratadas com PbHsp60r (dados não mostrados), sugerindo que nesse caso a supressão era devida à produção NO. Além disso, quando a proliferação celular induzida por ConA é bloqueada por NO, aparentemente não há aumento nem diminuição significativo do número de células quando comparado ao controle não estimulado (BOCCA, A. L. et al., 1998; SOUTO et al., 2000). Isso não foi observado no presente estudo, onde PbHsp60r bloqueou a proliferação de células esplênicas estimuladas por ConA e diminuiu em cerca de

20% a quantidade de células em relação ao controle não estimulado. Curiosamente, foi mostrado que a redução ocorre principalmente na população das células não aderentes – populações de linfócito T CD4, linfócitos T CD8 e linfócito B estavam reduzidas após 24 horas de estímulo com PbHsp60r.

Partindo dos resultados acima, buscou-se descobrir qual seria o mecanismo que estava acarretando na redução das células. A descoberta que a morte das células estava correlacionada com a sinalização pelo receptor TLR4 e pela proteína adaptadora TRIF, permitiu aventar possíveis mecanismos que estivesse relacionados com essa via de sinalização (CREAGH, 2014). Dentre esses mecanismos, TNF poderia figurar como molécula importante (JORGENSEN et al., 2017). Realmente, o uso de anticorpos contra TNF bloqueou a diminuição do número de células esplênicas induzidas por PbHsp60r. Além disso, a utilização de animais deficiente do receptor de TNF mostrou que a morte induzida por PbHsp60r também dependia desse receptor. A morte disparada pela ligação de TNF ao receptor TNFR1 pode ser causada tanto por necroptose quanto por apoptose (BRENNER et al., 2015) a depender exclusivamente de como será feito o balanço entre sinais pró- e anti-apoptóticos (TSENG et al., 2018). Um dado bastante interessante foi a não ocorrência da morte das células esplênicas aderentes quando estimuladas por PbHsp60r. Isso pode ser decorrente da ativação de NF- κ B que protegeria essas células da morte por meio do aumento da transcrição dos fatores anti-apoptóticos (KARIN; LIN, 2002; MICHEAU et al., 2001). Em relação às células não aderentes, principalmente os linfócitos, a explicação do fenômeno de morte torna-se mais complicado. De fato, anticorpos contra TNF aprovados para uso clínico em seres humanos induz morte de linfócitos T de pacientes com doenças inflamatórias intestinais por apoptose. No entanto, essa morte ocorre indiretamente, uma vez que esses anticorpos possuem como alvo a via de ativação dependente de TNF de membrana (TNFm)/TNFR2 (ATREYA et al., 2011). Curiosamente, outros trabalhos tem mostrado que TNFR2 induz uma série de moléculas anti-apoptóticas (CALZASCIA et al., 2007; CHEN et al., 2010; KIM et al., 2006; LIN et al., 1997; ZHANG et al., 2013). Apesar dos relatos da ação de anticorpos que fazem ligação cruzada de TNFm induzir apoptose e regular positivamente IL-10 e outras moléculas supressoras (MITOMA et al., 2005), este constitui-se um campo ainda bastante inexplorado.

No presente trabalho, a via de morte das células esplênicas induzida por PbHsp60r foi dependente de TNFR1. Embora a sobrevivência seja a resposta padrão da maioria das células ao TNF de um modo dependente de NF- κ B, estudos recentes mostram a existência de um ponto de checagem de morte celular independente de NF- κ B que restringe a morte por inativação da proteína serina/treonina cinase de interação com receptor 1 (RIPK1) (TING; BERTRAND,

2016). De fato, RIPK1 está diretamente envolvida com as vias de apoptose e necroptose induzida pela ativação de TNFR1, a depender dos parceiros moleculares aos quais essas moléculas se associam. Isso traz uma complicação adicional, na qual múltiplos eventos poderiam ocorrer simultaneamente a ativação de TNFR1, resultando em inflamação, morte celular por apoptose ou necroptose (TSENG et al., 2018). Nos casos dos linfócitos T, por exemplo, subpopulações dessas células e estágios de ativação poderão apresentar uma variação na sensibilidade a indução de morte celular induzida por TNF (GUPTA et al., 2005). Soma-se a isso, fatores externos, como agentes infecciosos que podem modular o processo de sobrevivência e morte celular. Recentemente, Hojo-Souza et al. (2015) relataram que a infecção com *Plasmodium vivax* pode induzir apoptose de linfócitos T indiretamente pela ativação de TNFR1, em um possível mecanismo de evasão do sistema imunitário desencadeado pelo parasita (HOJO-SOUZA et al., 2015). Apesar de o efeito de TNF em processos infecciosos ser algo bastante explorado, há ainda lacunas no conhecimento que necessitam de investigação, sendo uma delas a que se refere ao papel de TNF induzidos pelos patógenos no destino das células do sistema imunológico.

6. CONCLUSÕES

- A PbHsp60r e a vacina gênica pVAX1-PB_HSP60 induzem uma resposta benéfica em camundongos previamente infectados com *P. brasiliensis* quando aplicada em três doses, reduzindo carga fúngica e lesão pulmonares,
- Quando aplicada em dose única, pVAX1-PB_HSP60 não trouxe melhora no quadro da PCM experimental, diferente de PbHsp60r que induziu um piora no quadro infeccioso
- A PbHsp60r induz *in vitro* a morte de células esplênicas de animais *naïves* ou previamente infectados e imunizados com essa proteína, sendo os linfócitos as células mais afetadas,
- A morte celular induzida por PbHsp60r é dependente da sinalização de TLR4 via molécula adaptadora TRIF, o que leva a produção de TNF que induz a morte celular via TNFR1.

7. REFERÊNCIAS

- ALEGRE, A. C. P. et al. Recombinant Paracoccin Reproduces the Biological Properties of the Native Protein and Induces Protective Th1 Immunity against *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2788, 2014.
- ATREYA, R. et al. Antibodies Against Tumor Necrosis Factor (TNF) Induce T-Cell Apoptosis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases via TNF Receptor 2 and Intestinal CD14⁺ Macrophages. **Gastroenterology**, v. 141, n. 6, p. 2026-2038, 2011.
- BAZAN, S. B. et al. Loss- and Gain-of-Function Approaches Indicate a Dual Role Exerted by Regulatory T Cells in Pulmonary *Paracoccidioidomycosis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004189, 2015.
- BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2007.
- BOCCA et al. *Paracoccidioidomycosis*: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1177-1191, 2013.
- BOCCA, A. L. et al. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-Infected Mice with a Nitric Oxide Inhibitor Prevents the Failure of Cell-Mediated Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 6, p. 3056-3063, 1998.
- BRENNER et al. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, p. 362, 2015.
- BRUMMER et al. *Paracoccidioidomycosis*: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.
- BUCKWALTER, M. R.; SRIVASTAVA, P. K. "It is the antigen(s), stupid" and other lessons from over a decade of vaccitherapy of human cancer. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 5, p. 296-300, 2008.
- CALICH et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4, p. 223-236, 2008.
- CALICH; 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.
- CALICH et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British journal of experimental pathology**, v. 66, n. 5, p. 585-594, 1985.

CALICH, V. L. G.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, v. 66, n. 3, p. 175-177, 1979.

CALVI, SUELI A. et al. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 2, p. 107-113, 2003.

CALZASCIA, T. et al. TNF- α is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 12, p. 3833-3845, 2007.

CANO, L. E. et al. Protective Role of Gamma Interferon in Experimental Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 800-806, 1998.

CAVASSANI, K. A. et al. Cell-Free Antigens from Paracoccidioides brasiliensis Drive IL-4 Production and Increase the Severity of Paracoccidioidomycosis. **PLOS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21423, 2011.

CHEN, X. et al. Expression of Costimulatory TNFR2 Induces Resistance of CD4⁺FoxP3⁺ Conventional T Cells to Suppression by CD4⁺FoxP3⁺ Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 1, p. 174-182, 2010.

CHEONG et al. Targeting the IDO1/TDO2;AhR Pathway for Cancer Immunotherapy Challenges and Opportunities. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 3, p. 307-325, 2018.

COLTRI, K. C. et al. Therapeutic Administration of KM+ Lectin Protects Mice Against Paracoccidioides brasiliensis Infection via Interleukin-12 Production in a Toll-Like Receptor 2-Dependent Mechanism. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 2, p. 423-432, 2008.

COSTA, T. A. et al. In Pulmonary Paracoccidioidomycosis IL-10 Deficiency Leads to Increased Immunity and Regressive Infection without Enhancing Tissue Pathology. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. e2512, 2013.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 5771-5777, 2008.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 1441-1454, 2002.

CREAGH, E. M. Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 12, p. 631-640, 2014.

CUNHA, D. A. et al. Heterologous Expression, Purification, and Immunological Reactivity of a Recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 2, p. 374-377, 2002.

DE ARAÚJO, E. F. et al. The IDO–AhR Axis Controls Th17/Treg Immunity in a Pulmonary Model of Fungal Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 880, 2017.

DE OLIVEIRA, L. L. et al. T Helper 1–Inducing Adjuvant Protects against Experimental Paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 3, p. e183, 2008.

DEMBIC, Z. Chapter 3 - Activation of Cells of the Immune System. In: DEMBIC, Z. (Ed.). **The Cytokines of the Immune System**. Amsterdam: Academic Press, 2015. p.57-98. ISBN 978-0-12-419998-9.

DRUMMOND, R. A. et al. Innate Defense against Fungal Pathogens. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 6, p. a019620, 2015.

FELONATO, M. et al. Anti-CD25 Treatment Depletes Treg Cells and Decreases Disease Severity in Susceptible and Resistant Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. e51071, 2012.

FEOKTISTOVA, M. et al. Techniques to Distinguish Apoptosis from Necroptosis. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 4, p. pdb.top070375, 2016.

FERIOTTI et al. NOD-Like Receptor P3 Inflammasome Controls Protective Th1/Th17 Immunity against Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 786, 2017.

FERNANDES, F. F. **Hsp60 recombinante de Paracoccidioides brasiliensis reverte a proteção induzida por adjuvante na paracoccidioidomicose experimental**. 2013. 88 p. tese

(Doutorado). Universidade de São Paulo, 2013.

FERNANDES, F. F. et al. Detrimental Effect of Fungal 60-kDa Heat Shock Protein on Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162486, 2016.

FERNANDES, V. C. et al. The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12, p. 1062-1072, 2011.

FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Immunol Lett**, v. 103, n. 2, p. 121-126, 2006.

FORTES, M. R. P. et al. Imunologia da paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 516-524, 2011.

GUPTA, S. et al. Life and death of lymphocytes: a role in immunesenescence. **Immunity & Ageing**, v. 2, n. 1, p. 12, 2005.

HASSON, S. S. A. A.; AL-BUSAIDI, J. K. Z.; SALLAM, T. A. The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 5, p. 344-353, 2015.

HAYNES, C. M.; RON, D. The mitochondrial UPR – protecting organelle protein homeostasis. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 22, p. 3849-3855, 2010.

HICKEY, M. J. et al. Tumor necrosis factor- α induces leukocyte recruitment by different mechanisms in vivo and in vitro. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 7, p. 3391-3400, 1997.

HOJO-SOUZA, N. S. et al. CD4⁺ T cells apoptosis in Plasmodium vivax infection is mediated by activation of both intrinsic and extrinsic pathways. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 5, 2015.

HOWARD, C. J. et al. The role of dendritic cells in shaping the immune response. **Animal Health Research Reviews**, v. 5, n. 2, p. 191-195, 2007.

IZACC, S. M. S. et al. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis. **Medical Mycology**, v. 39, n. 5, p. 445-455, 2001.

JORGENSEN et al. Programmed cell death as a defence against infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, p. 151, 2017.

KALMAR, E. M. N. et al. Paracoccidioidomycosis: an epidemiologic survey in a pediatric population from the brazilian amazon using skin tests. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 82-86, 2004.

KARIN, M.; LIN, A. NF- κ B at the crossroads of life and death. **Nature Immunology**, v. 3, p. 221, 2002.

KASHINO et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection Is Linked to a Preferential Th1 Immune Response, Whereas Susceptibility Is Associated with Absence of IFN-gamma Production. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 20, n. 1, p. 89-97, 2000.

KASHINO et al. In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathologia**, v. 92, n. Issue 3, p. pp 173–178, 1985.

KIM, E. Y. et al. TNF Receptor Type 2 (p75) Functions as a Costimulator for Antigen-Driven T Cell Responses In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 2, p. 1026-1035, 2006.

LANDGRAF et al. Involvement of Dihydrolipoyl Dehydrogenase in the Phagocytosis and Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by Macrophages. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1803, 2017a.

LANDGRAF et al. Therapeutic effect of monophosphoryl lipid A administration on *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. **Medical Mycology**, v. 55, n. 3, p. 344-348, 2017b.

LIN, R. H. et al. TNF receptor-2-triggered apoptosis is associated with the down-regulation of Bcl-xL on activated T cells and can be prevented by CD28 costimulation. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 2, p. 598-603, 1997.

LIONAKIS, M. S.; ILIEV, I. D.; HOHL, T. M. Immunity against fungi. **JCI Insight**, v. 2, n. 11, 2017.

LOURES, F. V. et al. TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 261, 2015.

LOURES, F. V. et al. MyD88 Signaling Is Required for Efficient Innate and Adaptive Immune Responses to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 6, p. 2470-2480, 2011.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, p. 135-146, 2003.

MARTINEZ, R. EPIDEMIOLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 11-20, 2015.

Martinez, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Ido expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 762, 2004.

MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, p. 224-282, 2017.

MICHEAU, O. et al. NF- κ B Signals Induce the Expression of c-FLIP. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 16, p. 5299-5305, 2001.

MITOMA, H. et al. Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF- α . **Gastroenterology**, v. 128, n. 2, p. 376-392, 2005.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 683-765, 2001.

MURSHID, A.; GONG, J.; CALDERWOOD, S. The Role of Heat Shock Proteins in Antigen Cross Presentation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 63, 2012.

OHASHI, K. et al. Cutting Edge: Heat Shock Protein 60 Is a Putative Endogenous Ligand of the Toll-Like Receptor-4 Complex. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 2, p. 558-561, 2000.

PAGLIARI, C. et al. Paracoccidioidomycosis: Cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. **Microbial Pathogenesis**, v. 50, n. 5, p. 263-267, 2011.

PERON, G. et al. Recombinant 60-kDa heat shock protein from Paracoccidioides brasiliensis: is it a good antigen for serological diagnosis of paracoccidioidomycosis? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, 2017.

PINA, A. et al. Myeloid Dendritic Cells (DCs) of Mice Susceptible to Paracoccidioidomycosis Suppress T Cell Responses whereas Myeloid and Plasmacytoid DCs from Resistant Mice Induce Effector and Regulatory T Cells. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 4, p. 1064-1077, 2013.

PINO-TAMAYO, P. A. et al. Depletion of Neutrophils Exacerbates the Early Inflammatory Immune Response in Lungs of Mice Infected with Paracoccidioides brasiliensis. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 17, 2016.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e367-e377, 2017.

RAMOS-E-SILVA, M.; SARAIVA, L. D. E. S. Paracoccidioidomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 26, n. 2, p. 257-269, 2008.

RESTREPO, A.; GÓMEZ, B.; TOBON, A. **Paracoccidioidomycosis: Latin America's Own Fungal Disorder**. 2012.

RIBEIRO, A. M. et al. HSP65 DNA as therapeutic strategy to treat experimental paracoccidioidomycosis. **Vaccine**, v. 28, n. 6, p. 1528-1534, 2010.

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 253-266, 2010.

RITTNER, G. M. G. et al. Therapeutic DNA Vaccine Encoding Peptide P10 against Experimental Paracoccidioidomycosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1519, 2012.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 11, 2004.

Romani, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 275, 2011.

SHANKAR, J. et al. Hormones and the Resistance of Women to Paracoccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 296-313, 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 0-0, 2017.

SIFUENTES-OSORNIO et al. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 1, p. 23-34, 2012.

SOUTO, J. T. et al. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Determine Resistance to Paracoccidioides brasiliensis Infection in Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p. 1811-1820, 2000.

SPERANDIO, F. F. et al. Resistance to P. brasiliensis Experimental Infection of Inbred Mice Is Associated with an Efficient Neutrophil Mobilization and Activation by Mediators of Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 10, 2015.

TEIXEIRA, M. M. et al. Paracoccidioides Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 2014.

TING, A. T.; BERTRAND, M. J. M. More to Life than NF- κ B in TNFR1 Signaling. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 8, p. 535-545, 2016.

TRIMBLE, C. L. et al. A Phase I Trial of a Human Papillomavirus DNA Vaccine for HPV16+ Cervical Intraepithelial Neoplasia 2/3. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 1, p. 361-367, 2009.

TRISTÃO, F. S. M. et al. Th17-Inducing Cytokines IL-6 and IL-23 Are Crucial for Granuloma Formation during Experimental Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 949, 2017.

TSENG, W.-Y. et al. TNFR signalling and its clinical implications. **Cytokine**, v. 101, p. 19-25, 2018.

VAN DE VEERDONK et al. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 305-312, 2008.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. Heat shock protein 60 enhances CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 2022-2032, 2006.

ZHANG, Q. et al. TNF- α impairs differentiation and function of TGF- β -induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 2, p. 85-98, 2013.

ZÜGEL, U.; KAUFMANN, S. H. E. Role of Heat Shock Proteins in Protection from and Pathogenesis of Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 19-39, 1999.

8. APÊNDICE

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

Campus de Ribeirão Preto

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do efeito terapêutico de plasmídeos vacinais contendo o gene da proteína de estresse térmico de 60kDa de *Paracoccidioides brasiliensis* na paracoccidioidomicose experimental em camundongos", protocolo nº 15.1.1770.59.0, sob a responsabilidade de Igor Emiliano Lemos de Souza e Ademilson Panunto Castelo que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (CEUA FFCLRP) *Ad referendum* Colaboradores: Taise Natali Landgraf.

Vigência do Projeto	20/03/2016 a 20/03/2018
Espécie/Linhagem	Camundongo BALB/c
Nº de animais	312
Peso/Idade	25g / 6-8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 14 de março de 2016.

Prof. Dra. Cláudia Maria Padovan
 Vice-Presidente da CEUA FFCLRP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

INFORMAÇÃO

A Comissão de Ética em Experimentação Animal entende que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº146/2007, sobre o projeto intitulado "*Avaliação do potencial terapêutico de indutores de resposta th1 no curso da paracoccidiodomicose experimental.*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor Ademilson Panunto Castelo**, continua válido, desde que não haja nenhuma alteração nos procedimentos com os animais de experimentação.

Sendo assim, não existe a necessidade de atualizarmos o referido protocolo para a realização deste trabalho.

Ribeirão Preto, 29 de julho de 2013.

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal, em exercício