Diego Conrado Pereira Rossi

Paracoccidioides lutzii e outros fungos de importância médica: desenvolvimento de vacina terapêutica e tratamento alternativo com compostos sintéticos no controle das micoses sistêmicas.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

Diego Conrado Pereira Rossi

Paracoccidioides lutzii e outros fungos de importância médica: desenvolvimento de vacina terapêutica e tratamento alternativo com compostos sintéticos no controle das micoses sistêmicas.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Conrado Pereira Rossi, Diego

Paracoccidioides lutzii e outros fungos de importância médica: desenvolvimento de vacina terapêutica e tratamento alternativo com compostos sintéticos no controle das micoses sistêmicas. / Diego Conrado Pereira Rossi; orientador Carlos Pelleschi Taborda. -- São Paulo, 2017.
142 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Micoses de interesse médico. 2. Desenvolvimento e vacinas. 3. Paracoccidioidomicose. 4. Candidíase. 5. Criptococose. I. Pelleschi Taborda, Carlos , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Diego Conrado Pereira Rossi

Título da Tese: Paracoccidioides lutzii e outros fungos de importância médica:
desenvolvimento de vacina terapêutica e tratamento alternativo com compostos sintéticos no
controle das micoses sistêmicas.

Orientador(a): Carlos Pelleschi Taborda

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **042** nas fls. **127** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Carlos Pelleschi Taborda**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Paracoccidioides lutzii*: novos desafios no desenvolvimento de uma vacina terapêutica. Fase 1: modelo experimental murino" do qual participam o(s) alunos(s) **Diego Conrado Pereira Rossi**, **Julian Esteban Munõz**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **10.04.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 12 de abril de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico esse trabalho a Norma e Jadyr, pois sem eles nada aconteceria.

AGRADECIMENTOS

Acho que sempre que chego no fim de um ciclo da minha vida eu sempre me lembro como tudo começou. Agora, pensando bem, eu não seria nada sem os meus pais. Posso me considerar um ser iluminado e abençoado por ter uma MÃE como a minha. Ela nunca hesitou em se sacrificar e se doar para que eu seguisse com os meus estudos. Sempre me incentivou correr atrás dos meus sonhos, não importa onde (Austrália ou EUA). MÃE, muito obrigado por você estar na minha vida e por tudo que você fez, faz e fará por mim. Meu PAI é uma pessoa que, assim como minha mãe, sempre me ajudou e me incentivou a estudar, ser alguém na vida (nas palavras dele). Espero que quando você ler essa mensagem de agradecimento, mesmo não sabendo do que está acontecendo ao seu redor, seu coração se encha de alegria e orgulho. Muito obrigado PAI. Vania, muito obrigado por sempre estar ao lado do meu PAI e sempre me ajudar das mais diversas maneiras. Sinceramente, o que seria de mim sem você resolvendo meus “pepinos”.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Carlos Pelleschi Taborda, que sempre me apoiou e me deu essa oportunidade de trabalhar com ele. Muito obrigado Chefe!

Julian, Puti, também gostaria de dizer muito obrigado. Nossa parceria rendeu e renderá muito. Obrigado Padrinho!

Cleison, muito obrigado por sempre me ajudar e ser um amigo querido. Se não fosse por você garanto que as coisas seriam muito mais difíceis.

Gostaria de agradecer todos os membros do Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos, que estavam comigo durante minha passagem por lá: Leandro, Lucas, Shirley, Zita, Martha, Oriana, Thor, Luciana, Ana Camila e Eluzia. Muito obrigado pessoal, sem vocês tenho certeza que a caminhada seria muito mais árdua e nada divertida.

Professora Elaine Rodrigues, muito obrigado por sempre estar presente, desde do mestrado até o doutorado. Você sempre faz a diferença.

Gostaria de agradecer muito ao Dr. Arturo Casadevall que permitiu que eu fizesse parte do seu grupo durante 1 ano. Foi fantástico e aprendi muito. Eric Jung, obrigado por ser um bom amigo e sempre me ajudar com os seus conselhos sábios.

E a todos que participaram diretamente e indiretamente desse trabalho. MUITO OBRIGADO!

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Processo FAPESP 2012/08760-1

Processo FAPESP BEPE 2015/12909-9

“Se manter de pé, contra o
que vier, vencer os medos,
mostrar ao que veio, ter o foco ali,
e sempre seguir rumo a vitória!”

Dead Fish

RESUMO

Rossi DCP. *Paracoccidioides lutzii* e outros fungos de importância médica: desenvolvimento de vacina terapêutica e tratamento alternativo com compostos sintéticos no controle das micoses sistêmicas. [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica causada pelos fungos dimórfico *Paracoccidioides* spp.. *Cryptococcus neoformans*, o agente etiológico predominante da criptococose, pode causar infecções do sistema nervoso central, colocando em risco de vida indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes. Candidíase vulvovaginal ou invasiva é uma condição frequente em indivíduos imunossuprimidos. O agente etiológico são leveduras do gênero *Candida*. Os tratamentos antifúngicos são ineficazes e as recaídas podem, contudo, ocorrer apesar da terapia prolongada. O presente trabalho foi dividido em 3 capítulos, onde em cada capítulo discutimos tratamentos alternativos para o controle da paracoccidioidomicose, criptococose e candidíase. **Capítulo 1**, o objetivo foi prospectar novos epítomos para uma possível vacina terapêutica para paracoccidioidomicose e criptococose. Foram desenvolvidos dois sistemas distintos de prospecção de epítomos. i) visou a produção de antígenos a partir da parede celular e no sobrenadante de cultura de *Paracoccidioides* spp. i) teve o objetivo de purificar epítomos naturalmente apresentados por macrófagos via MHCII. **Capítulo 2** avaliou os efeitos antifúngicos da miltefosina sobre as formas de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. A miltefosina, um análogo de alquilfosfolípidos, tem atividade antifúngica contra espécies de leveduras e fungos filamentosos. A miltefosina demonstrou atividade inibitória de 0,12 a 1 µg / ml, na qual foi semelhante à anfotericina B ou à combinação de sulfametoxazol e trimetoprim. A atividade fungicida da miltefosina ocorreu nas concentrações ≥ 1 µg / ml. Alterações ultraestruturais foram observadas após a exposição do fungo à concentração sub-inibitória, tais como alteração da membrana citoplasmática, inchaço mitocondrial, acúmulo de vacúolos eletroiluminescentes e aumento de estruturas tipo melanosoma. A produção de melanina por leveduras após a exposição à miltefosina foi confirmada por marcação com anticorpos para a melanina. Além disso, a combinação de concentrações sub-inibitórias de miltefosina e triciclazol reduziu drasticamente a viabilidade da levedura. Conclui-se que a miltefosina teve efeito fungicida contra ambas as espécies de *Paracoccidioides* e que a concentração sub-inibitória tem impacto na melanogênese. **Capítulo 3** estudou a atividade antifúngica do C7a no modelo *in vitro* e *in vivo*. Nossos resultados mostraram atividade fungicida com baixos valores de concentrações inibitórias mínimas e concentração mínima fungicida. Microscopia de fluorescência e microscopia de varredura revelaram que o composto foi capaz de inibir a formação de hifas / pseudo-hifas, além disso, promoveu alterações morfológicas em algumas organelas e estruturas. C7a diminuiu significativamente a formação de biofilme quando testado contra cepas virulentas de *C. albicans*. Os ensaios *in vivo* demonstraram uma diminuição significativa do crescimento fúngica em camundongos infectados intravaginalmente e intravenosamente. Além disso, observou-se um aumento significativo na sobrevivência dos animais que foram tratados com C7a.

Nossos resultados sugerem que C7a tem potencial para ser uma alternativa ao tratamento da candidíase.

Palavras chaves: Micoses de interesse médico. Desenvolvimento de vacinas. Paracoccidioidomicose. Candidíase. Criptococose.

ABSTRACT

Rossi DCP. *Paracoccidioides lutzii* and other fungi of medical importance: development of therapeutic vaccine and alternative treatment with synthetic compounds in the control of systemic mycoses. [Ph. D. thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis caused by dimorphic fungi *Paracoccidioides spp.*. *Cryptococcus neoformans*, the predominant etiological agent of cryptococcosis, can cause infections of the central nervous system, posing an immunocompromised and immunocompetent risk of life. Vulvovaginal or invasive candidiasis is a common condition in immunosuppressed individuals. The etiologic agent is yeast of the genus *Candida*. Antifungal treatments are ineffective and relapses can, however, occur despite prolonged therapy. The present work was divided into three chapters, where each chapter discussed alternative treatments for the control of paracoccidioidomycosis, cryptococcosis and candidiasis. **Chapter 1**, the objective was to prospect new epitopes for a possible therapeutic vaccine for Paracoccidioidomycosis and Cryptococcosis. Two different epitope prospecting systems were developed. i) aimed in the production of antigens from cell wall and in the culture supernatant of *Paracoccidioides spp.* ii) had the objective of purifying epitopes naturally presented by macrophage via MHCII. **Chapter 2** Evaluation of the antimicrobial effects of the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. Miltefosine, an analog of alkylphospholipids, has antifungal activity against yeast and filamentous fungi species. Miltefosine demonstrated activity at 0.12 to 1 µg / ml, in which it was either amphotericin B or a combination of sulfamethoxazole and trimethoprim. The fungicidal activity of miltefosine occurred at concentrations ≥ 1 µg / ml. Ultrastructural alterations were observed after an examination of fungi at the subinhibitory concentration, such as cytoplasmic membrane alteration, mitochondrial swelling, accumulation of electro-luminescent vacuum and increase of melanosome-like structures. The production of melanin by yeast after exposure was confirmed by labeling with antibodies to melanin. In addition, a combination of sub-inhibitory concentrations of miltefosine and tricyclazole drastically reduced yeast viability. It is concluded that miltefosine had a fungicidal effect against both species of *Paracoccidioides* and that the subinhibitory concentration has an impact on melanogenesis. **Chapter 3** studied an antifungal activity of C7a without model *in vitro* and *in vivo*. Our results showed fungicidal activity with low values of minimum inhibitory concentrations and minimal fungicidal concentration. Fluorescence microscopy and scanning microscopy reveal that the compound can inhibit a formation of hyphae / pseudohyphas, in addition, has promoted morphological changes in some structures and structures. C7a significantly decreased biofilm formation when tested against virulent strains of *C. albicans*. In vivo assays demonstrated a significant decrease in fungal growth in mice infected intravaginally and intravenously. In addition, a significant increase in the survival of the animals that were treated with C7a was observed. Our results suggest that C7a has the potential to be an alternative to the treatment of candidiasis.

Keywords: Mycoses of medical interest. Development of vaccines. Paracoccidioidomycosis. Candidiasis. Cryptococcosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Perfil de proteínas dos isolados de *P. lutzii* (Pb01, ED01, Pb1578) e de *P. brasiliensis* (isolado Pb339), cultivados em meio Fava Netto por 15 dias à 37 °C. Gel de poliacrilamida-SDS 10% corado com nitrato de prata. **1.** Padrão de massa molecular em kDa; **2.** Pb339; **3.** Pb01; **4.** ED01; **5.** 1578.....**47**

Figura 1.2. Western Blot de uma amostra do concentrado de sobrenadante do cultivo em meio Fava Netto de 15 dias do isolados Pb01. Foram utilizados soros provenientes de 10 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c. As amostras entre a primeira e a oitava 8 foram infectadas com 10^7 leveduras de Pb01 pela via intraperitoneal, e da nona a décima os animais foram infectados com 10^6 leveduras pela via intratraqueal.....**48**

Figura 1.3. Western Blot de extração de antígeno de parede **(A)** 7 dias, **(B)** 15 dias e **(C)** exoantígeno de 15 dias de cultivo. Os isolados da espécie *lutzii*: Pb01, ED01, 1578 e 66 e da espécie *brasiliensis* 339 foram crescidos em meio Fava Netto à 37 °C.....**51**

Figura 1.4. Cromatografia de gel filtração de amostra de exoantígeno **(A 280nm e B 214nm)**, de parede 7 dias **(C 280nm e D 214 nm)** e 15 dias **(E 280nm e F 214nm)**. As corridas foram feitas em tampão PBS, pH 7,5 e o fluxo foi de 1mL por minuto. A corrida foi de 1 hora e foram coletadas 36 frações. A coluna utilizada foi a Superose 6 10/300 GL (0,1 x 30 cm).....**52**

Figura 1.5. Dot blot das frações oriundas da purificação das amostras de Pb01 de extração de parede de 7 dias **(A)** e 15 dias **(B)** e do exoantígeno **(C)**. O ensaio foi realizado com o soro de camundongos infectados com Pb01.....**53**

Figura 1.6. SDS-PAGE 10% das frações oriundas da coluna de gel filtração. A e B, Frações 7 e 8 da corrida do concentrado do meio de cultura. C, Fração 8 da corrida da extração de parede de 7 dias. D, fração 8 da corrida da extração de parede de 15 dias. O gel foi corado com prata.....**54**

Figura 1.7. Perfil de proteínas do isolado Pb01 de *P. lutzii* cultivado em meio F-12 por 7 dias a 37 °C. Gel de poliacrilamida-SDS 10% corado com coomassie blue. **A**, Concentrado do meio de cultura. **B**, extração proteica de parede.....**56**

Figura 1.8. Perfil de proteínas do isolado Pb01 de *P. lutzii* cultivado em meio F-12 por 7 dias à 37 °C. Gel de poliacrilamida-SDS 15% corado com coomassie blue. **A**, Concentrado do meio de cultura. **B**, extração proteica de parede.....**57**

Figura 1.9. Western Blot do concentrado de meio de cultura F-12 **(A)** e extração de parede **(B)**. O isolado Pb01 foi cultivado em meio F-12 por 7 dias à 37°C.....**58**

1.10. Estratégia de seleção positiva utilizada nas análises de fagocitose e expressão de MHCII de macrófagos que fagocitaram leveduras de Pb01 e *Cryptococcus* spp. **SSC-A** (área de Side scatter), **FSC-H** (altura de forward scatter), **SSC-W** (largura de Side scatter), **CD11b** (marcador de macrófago) **UVITEX 2B** (marcador de fungo) e **7AAD** (marcador de viabilidade).....**60**

Figura 1.11. Porcentagens de fagocitose e J774.16 **(A)** e macrófagos primários **(B)**. A fagocitose ocorreu nos tempos de 4 horas e 8 horas à 37 °C em 10% de CO₂. Foram utilizadas Leveduras **K99** (*C. neoformans*, com cápsula), **Cap59** (*C. neoformans*, sem cápsula), **R265** (*C. gatii*, com capsula) e **Pb01** (*P. lutzii*). Para os isolados K99 e R265 foi utilizado o anticorpo monoclonal IgG1 18B7 contra o componente GXM da cápsula e para o isolado CAP59 e Pb01 foi utilizado complemento fresco de cobaia. Representação de 3 experimentos independentes feitos em triplicata.....**61**

Figura 1.12. Expressão de MHCII de macrófagos J774.16 **(A)** e macrófagos primários **(B)** que fagocitaram as leveduras **K99** (*C. neoformans*, com cápsula), **Cap59** (*C. neoformans*, sem cápsula), **R265** (*C. gatii*, com capsula) e **Pb01** (*P. lutzii*). A fagocitose ocorreu nos tempos de 4 horas e 8 horas à 37 °C em 10% de CO₂. Para os isolados K99 e R265 foi utilizado o anticorpo monoclonal IgG1 18B7 contra o componente GXM da cápsula e para o isolado CAP59 e Pb01 foi utilizado complemento fresco de cobaia. **Letras**, significam diferenças estatísticas significantes, o teste usado foi ANOVA com pós teste de Tukey $p < 0,005$. **, significa diferenças estatísticas significantes, o teste usado foi o teste T, *two tailed*, $p < 0,001$. Representação de 3 experimentos independentes feitos em triplicata.....**62**

Figura 1.13. Estratégia de seleção positivas dos linfócitos primados de camundongos imunizados com leveduras de Pb01 e *Cryptococcus* spp.. **SSC-A** (área de Side scatter), **CD3** (marcador de linfócito), **7AAD** (marcador de viabilidade) e **Cell Trace far Red** (indicador de proliferação).....**65**

Figura 1.14. Porcentagens de proliferação de linfócitos em co-cultura com J774.16 **(A)** e macrófagos primários **(B)**. A fagocitose ocorreu nos tempos de 4 horas e 8 horas à 37 °C em 10% de CO₂. Após o tempo de fagocitose as células foram fixadas e linfócitos recuperados de linfonodos de animais imunizados com as respectivas leveduras foram adicionados. Foram utilizadas Leveduras **K99** (*C. neoformans*, com cápsula), **Cap59** (*C. neoformans*, sem cápsula), **R265** (*C. gatii*, com capsula) e **Pb01** (*P. lutzii*). Para os isolados K99 e R265 foi utilizado o anticorpo monoclonal IgG1 18B7 contra o componente GXM da cápsula e para o isolado CAP59 e Pb01 foi utilizado complemento fresco de cobaia. Representação de 3 experimentos independentes feitos em triplicata.....**66**

Figura 1.15. Sequência da proteína hipotética de Pb18 (*P. brasiliensis*) e a localização do peptídeo sequenciado na amostra de fagocitose de 8 horas de macrófagos primários com Pb01.....**69**

Figura 1.16. Mapeamento *in silico* de epitopos a partir da sequência da proteína hipotética de Pb18. A análise foi realizada no NetMHCII 2.2 Server, onde estão

representados peptídeos com capacidade de ligação ao MHC de classe II, classificados com ligantes fortes (SB).....69

Figura 1.17. Mapeamento *in silico* de epítomos a partir da sequência da proteína hipotética de Pb18. A análise foi realizada no MHC-II Binding Prediction, onde o programa classificou os peptídeos na tabela em ordem decrescente de probabilidade de ligação ao MHC de classe II.....70.

Figura 2.1. Curvas de morte de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) (A) e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) (B). Tratadas com diferentes concentrações de MLT (0,5, 1, 2, 4, and 8 µg/mL) à 37 °C por 14 dias. Concentrações iguais ou acima da CIM (≥1 µg/mL) foram fungicidas, se mantendo no limite inferior de detecção.....88

Figura 2.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) (A-C) e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) (D-F). As leveduras foram tratadas com a concentração sub-inibitória de MLT (0,5 µg/mL) durante 14 dias à 37 °C. As leveduras controle, não tratadas (A e D) exibiram um citoplasma eletrodense contendo um ou mais núcleos (n), mitocôndrias (m) e vacúolos (v), bem como uma parede celular compacta e membrana citoplasmática (A e D). As leveduras tratadas com miltefosina (B, C e E, F) apresentaram alterações em suas membranas citoplasmáticas (inserções em B e E), acúmulo de vacúolos (B, C e E), inchaço mitocondrial (B, C e F) Números de partículas eletrodensas dentro de vacúolos (estruturas semelhantes a melanossomas) (setas em B, C, E e F). Barras = 1 µm; Barras inseridas = 0,1 µm.....91

Figura 2.3. Cortes ultrafinos de leveduras de *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) e *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18), numerosas estruturas tipo melanossoma em diferentes estágios de maturação. A matriz melanossômica em formação pode ser observada (A) e maturação de grânulos de melanina também pode ser observado devido à densidade crescente de elétrons (B e C). Os melanossomas aparecem próximos da membrana fúngica e depositados, possivelmente, na parede celular fúngica (D). Barras = 0,1 µm.....93

Figura 2.4. Média de intensidade de fluorescência de levedura de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) marcadas com anticorpo contra melanina 6D2. As leveduras não tratadas (C-) ou tratadas com concentrações subinibitórias de miltefosina (MLT 0,5 µg/mL) ou (0,5 µg/mL) combinadas com triciclazol (32 µg/mL) (MLT + TCZ) durante 14 dias à 37 °C. ** p <0,01 e *** p <0,001 em comparação com o C- (Anova-one way).....93

Figura 3.1. Leveduras de *Candida albicans* ATCC 10231 foram tratadas com concentração sub-inibitória do composto C7a (0,5 µg/mL) por 24 h a 35 °C em meio RMPI 1640 tamponado com MOPS 0,16 M. Após este período, células não tratadas (A-B) e tratadas com C7a (C-D) foram coradas com calcofluor White e leveduras e hifas/pseudohifas foram quantificadas (E). Podemos observar que o composto C7a foi capaz de inibir a formação de hifas/pseudohifas, a partir de quantificação feita por microscopia ótica. Barras = 20 µm.....116

Figura 3.2. Microscopia eletrônica de transmissão de levedura de *Candida albicans* ATCC 10231 não tratada **(A)** e tratada com concentração subinibitória de C7a (0,5 ug/ml) **(B, C e D)** durante 24 horas a 35 °C em RPMI 1640 tamponado com MOPS 0 16 M. Seta indica a marginalização de DNA. **N:** núcleo; **M** = mitocôndria; **V** = vacúolo. Barras = 1 micrómetro.....**117**

Figura 3.3 Efeito do composto C7a e anfotericina B no biofilme maduro **(A)** e na maturação do biofilme **(B)** de *C. albicans*. O ensaio foi realizado pelo método de XTT. Área em vermelho indica o limite negativo (D.O do branco e positivo (D.O do biofilme não tratado). * Teste *t* Two tailed comparado com o controle positivo, *P* <0,05.....**118**

Figura 3.4. Tratamento de camundongos infectados com a cepa ATCC 10231 de *C. albicans*. A avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama foi realizada a partir dos rins dos animais. A candidíase disseminada foi induzida por uma injeção intravenosa de 3×10^5 leveduras suspensas em 100 µL de PBS. O tratamento foi realizado a cada 24 horas durante sete dias após a infecção. Os animais foram tratados com 10 µg de C7a e 20 µg de fluconazol (FCZ). Como controle, os animais infectados receberam apenas PBS. * Indica significância estatística (ANOVA com teste pós-Tukey, *P* <0,05).....**120**

Figura 3.5. Tratamento de camundongos infectados com a cepa ATCC 10231 de *C. albicans*. Avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido foi realizada nas vaginas dos animais. A candidíase vaginal foi realizada inoculando 3×10^6 leveduras suspensas em 20 µL de PBS. O tratamento foi realizado a cada 24 horas durante sete dias. Os animais foram tratados com cremes a 2,5% e 5% de C7a, e 2% de miconazol (MCZ). Como controle, os animais infectados receberam apenas PBS em creme. * Indica significância estatística (ANOVA com teste pós-Tukey, *P* <0,05).....**120**

Figura 3.6. Cortes histológicos do canal vaginal de camundongos BALB / c infectados com *C. albicans* ATCC 10231 e tratados com MCZ (2%) ou composto C7a (5%). **(A)** animais infectados e tratados somente com o veículo, **(B)** animais infectados e tratados com MCZ, **(C)** animais infectados e tratados com composto C7a. Coloração de PAS com o aumento de 10X.....**121**

Figura 3.7. Sobrevivência de camundongos imunossuprimidos com candidíase disseminada. Os animais foram tratados com 100 mg/kg de ciclofosfamida e infectados com 10^4 leveduras de *C. albicans* ATCC 10231. O tratamento foi feito com 10 µg/Kg de C7a, 20 µg/kg de fluconazol (FCZ). Como controle, os animais infectados receberam somente PBS. * Indica a significância estatística (teste de Longo-Rank, *P* <0,05.....**121**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Identificação de sequências adquiridas por espectrometria de massas e confrontadas com o banco do genoma de <i>Paracoccidioides</i>	54
Tabela 1.2. Sequenciamento dos peptídeos purificados de macrófagos primários que fagocitaram K99 (<i>C. neoformans</i> , com cápsula), Cap59 (<i>C. neoformans</i> , sem cápsula), R265 (<i>C. gatii</i> , com capsula) e Pb01 (<i>P. lutzii</i>) após 8 horas de fagocitose.....	67
Tabela 2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) da MLT e de drogas antifúngicas frente a isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i>	87
Tabela 2.2. Viabilidade das leveduras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18) e <i>Paracoccidioides lutzii</i> (Pb01) após o tratamento de 7 dias à 37 °C de MLT associada ou não a concentração subinibitória de TCZ.....	90
Tabela 3.1. Valores da faixa de concentração inibitória mínima (CIM) do composto C7a em comparação com anfotericina B (AMB) e agentes azólicos miconazol (MCZ) e fluconazol (FCZ) sobre isolados clínicos de <i>Candida</i> spp.....	112
Tabela 3.2. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto C7a comparados com antifúngicos padrões - anfotericina B (AMB), miconazol (MCZ) e fluconazol (FCZ) – sobre cepas padrão e isolados clínicos de <i>Candida</i> spp. Valores de MIC e MFC estão em µg/mL.....	113
Tabela 3.3. Porcentagem cumulativa da concentração fungicida mínima (CFM) do composto C7a e Anfotericina B (AMB) sobre isolados clínicos de <i>Candida</i> spp.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
BHI	Brain Heart Infusion (infusão de cérebro e coração)
°C	Graus celcius
CIM	Concentração inibitória mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CD	cluster of differentiation
CO ₂	Dióxido de carbono
DCs	Células Dendríticas
DMSO	dimetilsulfóxido
D.O	Densidade Ótica
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
g	Relative centrifuge force-Gravities
gp 43	Glicoproteína de 43 kDa
GalXM	galactoxilomanana
GXM	glucuronoxilomanan
HTT	Hipersensibilidade Tipo Tardio
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
M	Molar
mM	Mili Molar
mg	Miligramas
mL	Mililitros
min	Minutos
NETs	neutrophil extracellular traps
PCM	paracoccidioidomicose
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFC	Unidade formadora de colônia

Sumário

<u>CAPITULO 1 – PROSPECÇÃO DE EPÍTOPOS FÚNGICOS A PARTIR DE EXOANTÍGENOS, ANTÍGENOS EXTRAÍDOS DE PAREDE CELULAR OU MOLÉCULAS APRESENTADOS PELO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE CLASSE II.</u>	22
1.1 INTRODUÇÃO	23
1.1.1 A PARACOCCIDIOIDOMICOSE	23
1.1.2 PARACOCCIDIOIDES LUTZII	26
1.1.3 IMUNOLOGIA DA PCM	27
1.1.4 A CRIPTOCOCCOSE	29
1.1.5 IMUNOLOGIA DA CRIPTOCOCCOSE	32
1.1.6 VACINAS PARA PARACOCCIDIOIMICOSE E CRIPTOCOCOSE	33
1.2 OBJETIVOS	37
1.2.1 OBJETIVO GERAL E JUSTIFICATIVA	37
1.2.2 ESPECÍFICOS	37
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
1.3.1 FUNGOS	39
1.3.2 OBTENÇÃO DO EXOANTÍGENO DE LEVEDURAS DE PARACOCCIDIOIDES SPP.	39
1.3.3 EXTRAÇÃO DE ANTÍGENO DE PAREDE PARACOCCIDIOIDES SPP.	39
1.3.4 WESTERN BLOT	40
1.3.5 OBTENÇÃO DE SORO POLICLONAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM P. LUTZII	40
1.3.6 CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO	40
1.3.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	41
1.3.8 ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	41
1.3.9 CULTURA CELULARES	42
1.3.10 ENSAIO DE FAGOCITOSE E EXPRESSÃO DE MHCII	42
1.3.11 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS	43
1.3.12 PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS	44
1.3.13 PREDIÇÃO IN SILICO DE EPÍTOPOS	45
1.4.1 EXTRAÇÃO DE EXOANTÍGENOS DE CULTURA DE PARACOCCIDIOIDES SPP. E ANTÍGENOS DE PAREDE CELULAR DE PARACOCCIDIOIDES SPP.	46

1.4.2 EXTRAÇÃO DE EXOANTIGENOS DE CULTURA DE PARACOCCIDIOIDES SPP. E ANTÍGENOS DE PAREDE CELULAR DE PARACOCCIDIOIDES SPP. UTILIZANDO O MEIO F12	55
1.4.3 FAGOCITOSE E EXPRESSÃO DE MHCII DE MACRÓFAGOS	59
1.4.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS	63
1.4.5. PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE EPITOPOS DE CRYPTOCOCCUS SPP. E PARACOCCIDIOIDES LUTZII (Pb01)	63
1.6 CONCLUSÃO	77

CAPÍTULO 2 - MILTEFOSINA, UM POTENCIAL ANTIFUNGICO PARA *PARACOCCIDIOIDES* SPP. QUE EM CONCENTRAÇÕES SUB INIBITÓRIAS INDUZ MELANIZAÇÃO

2.1 INTRODUÇÃO	79
2.2.1 GERAIS	81
2.2.2 ESPECÍFICOS	81
2.3.1 FUNGOS	82
2.3.2 DROGAS ANTIFÚNGICAS	82
2.3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA MLT IN VITRO	82
2.2.4 SINERGISMO ANTIFÚNGICO IN VITRO	83
2.2.5 CURVA DE MORTE	83
2.2.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	84
2.2.7 CITOMETRIA DE FLUXO	84
2.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	85
2.4 RESULTADOS	86
2.4.1 MILTEFOSINA EXIBE ATIVIDADE FUNGICIDA EM LEVEDURAS DE PARACOCCIDIOIDES SPP.	86
2.4.2 MLT COMBINADA COM TCZ REDUZ A VIABILIDADE DE LEVEDURAS DE PARACOCCIDIOIDES SPP.	89
2.4.3 MILTEFOSINA INDUZ ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LEVEDURAS DE PARACOCCIDIOIDES	89
2.4.4 ESTRUTURAS TIPO MELANOSOMA EM LEVEDURAS PARACOCCIDIOIDES SPP.	92
2.4.5 LEVEDURAS DE PARACOCCIDIOIDES SPP. PRODUZEM MELANINA APÓS A EXPOSIÇÃO DE UMA DOSE SUBLETAL DE MILTEFOSINA	92
2.5 DISCUSSÃO	94
2.6 CONCLUSÃO	97

CAPITULO 3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO COMPOSTO C7A CONTRA LEVEDURAS DE *CANDIDA ALBICANS* IN VITRO E IN VIVO

3.1.1 CANDIDÍASES	99
3.1.2 C7A	103
3.2 OBJETIVOS	105
3.2.1 GERAL	105
3.2.2 ESPECÍFICOS	105
3.3.1 MICROORGANISMOS	106
3.3.2 COMPOSTO CICLOPALADADO	106
3.3.2 ANTIFÚNGICOS	106
3.3.3 ENSAIO DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS DE CANDIDA SPP.	107
3.3.4 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COM CALCOFLUOR	107
3.3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	107
3.3.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA PARA BIOFILMES DE C. ALBICANS	108
3.3.7 ESTUDOS IN VIVO	108
3.3.8 MODELO EXPERIMENTAL	109
3.3.9 ANÁLISE DA CARGA FÚNGICA EM ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS	109
3.3.10 HISTOLOGIA	110
3.3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	110
3.4 RESULTADOS	111
3.4.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO	111
3.4.2 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE C. ALBICANS TRATADAS COM C7A	116
3.4.3 C7A INIBE A FORMAÇÃO DE BIOFILME E BIOFILMES MADUROS DE C. ALBICANS IN VITRO	116
3.4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO C7A IN VIVO	120
3.5 DISCUSSÃO	123
3.6 CONCLUSÃO	127
REFERENCIAS*	128

**CAPITULO 1 – PROSPECÇÃO DE EPÍTOPOS FÚNGICOS A PARTIR DE
EXOANTÍGENOS, ANTÍGENOS EXTRAÍDOS DE PAREDE CELULAR OU
MOLÉCULAS APRESENTADOS PELO COMPLEXO PRINCIPAL DE
HISTOCOMPATIBILIDADE CLASSE II.**

Nesse capítulo serão apresentados os dados do projeto de doutorado com ênfase na identificação de epitopos com potencial vacinal aplicados em *Paracoccidioides* spp. e *Cryptococcus* spp.. Este estudo foi realizado em colaboração com o Prof. Arturo Casadevall, The Johns Hopkins University - Bloomberg School of Public Health, e de Eric Jung, aluno de doutorado, Albert Einstein College of Medicine.

1.1 Introdução

1.1.1 A paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica granulomatosa, de caráter crônico, tendo como agente etiológico fungos do complexo *Paracoccidioides* spp. (1,2). O habitat de *Paracoccidioides* spp. ainda não foi determinado com precisão. Alguns isolamentos feitos a partir de amostras de solo de diferentes locais da Venezuela (3), Argentina (4) e Brasil (5–7) sustentam a hipótese do solo ser o habitat natural do fungo. Além disso, a análise genômica de amostras oriundas de animais como porco-da-índia (*Cavia aperea*), guaxinin (*Procyon cancrivoros*) e tatu (*Dasypus septemcinctus*), indicam que a infecção pelo fungo em animais selvagens pode ocorrer em áreas endêmicas (8).

Uma das principais características dos fungos do complexo *Paracoccidioides* é o dimorfismo térmico, isto é, à temperatura de 25 °C observa-se a forma micelial (filamentos multicelulares), que se caracteriza como a forma saprofítica ou infectante. Esses filamentos se transformam em leveduras, à temperatura de 35 a 37 °C, desenvolvendo assim sua forma patogênica (1,2).

A infecção é adquirida quando propágulos, provavelmente da fase micelial, do fungo são inalados e, através da via respiratória, instalam-se primariamente nos alvéolos pulmonares. Nesse momento, o fungo inicia a mudança para a fase leveduriforme, transformação considerada fundamental para que a infecção se estabeleça. A partir deste ponto, o fungo pode se disseminar por via hematogênica e ou linfática para qualquer parte do organismo (1,2). A PCM se manifesta majoritariamente em indivíduos do sexo masculino, entre 30 e 60 anos de idade, em sua maioria trabalhadores rurais nas áreas endêmicas. Outras características como tabagismo e consumo excessivo de álcool são considerados fatores de risco para o estabelecimento da doença (1,2). O hormônio 17- β -estradiol está relacionado ao dimorfismo do fungo conferindo às mulheres proteção contra a doença. Estudos mostram que, este hormônio inibe a transição do micélio para levedura de maneira dose-dependente (9). Acredita-se que a Proteína Ligante de Estradiol - PLE presente no citoplasma fúngico liga-se ao hormônio feminino 17- β -estradiol, como resultado desta interação, ocorre o bloqueio da

transição da fase infectante para a fase patogênica (10). O tipo de resposta imunológica desencadeada pelo sexo do animal também pode estar relacionado à proteção da PCM. Ao comparar a resposta imunológica de camundongos machos e fêmeas infectados com leveduras do complexo *Paracoccidioides*, verificou-se uma notável influência sobre o estabelecimento da PCM experimental sendo este fato atribuído, pelo menos em parte, aos hormônios sexuais que induzem uma resposta protetora (Th_1). Observou-se também que a paracoccidioidina, antígeno fúngico utilizado em testes intradérmicos, ativa com maior intensidade as células imunes inatas de fêmeas, fazendo com que estas sejam mais resistentes à infecção (11).

Casos já foram relatados em pacientes submetidos a tratamento citotóxico ou terapia imunossupressora contra o câncer (12), pacientes transplantados (13,14) e artrite reumatóide (15). Presume-se que fármacos citotóxicos podem reativar uma lesão latente, causando uma infecção pulmonar aguda, provavelmente pelo comprometimento do sistema imunológico devido ao tratamento químico e radioterápico.

A PCM é a mais importante micose sistêmica endêmica da América Latina e os países que possuem o maior número de casos são Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina. O Brasil possui 80% do total de casos, e as regiões sudeste, sul e centro-oeste são as mais prevalentes (16). A PCM é a oitava causa de mortalidade por doenças infecciosas crônicas, atingindo taxas de 1,65 óbitos por milhão de habitantes (1). No período de 1996 a 2006 ocorreram 517.058 mortes por doenças infecto-parasitárias no Brasil. As micoses sistêmicas foram responsáveis por 3.583 óbitos, sendo a paracoccidioidomicose citada, em aproximadamente, 51.2% dos óbitos registrados neste período, ocupando a décima posição, neste levantamento, entre as doenças infecto-parasitárias com alta mortalidade (17). Em 2010, foi estimado que há 3.360 novos casos de PCM por ano apenas no Brasil (18).

Há duas formas clínicas progressivas da doença: forma aguda ou subaguda (tipo juvenil), que envolve de 3 a 5% dos casos, é caracterizada por ter um curso mais rápido (semanas ou meses) e ser mais severa, apresentando envolvimento, principalmente no sistema reticuloendotelial (baço, fígado, nódulos linfáticos e medula), sendo raro o envolvimento pulmonar. Nos tecidos são encontrados fungos ativos e nenhum granuloma. Já a forma crônica (tipo adulto) ocorre em mais de 90% dos casos, nos

quais a doença demora meses ou anos para se estabelecer, sendo, na maioria das vezes, assintomática. As manifestações pulmonares são os melhores indicadores desta forma da doença, podendo também disseminar para outros órgãos e/ou sistemas. Os pacientes portadores da forma aguda da micose apresentam níveis de anticorpos altos dependendo, do nível de gravidade. A razão dessa dicotomia clínica não está clara e presume-se que características específicas da relação parasita-hospedeiro contribuam para isso (1,2,19).

O diagnóstico pode ser feito por exame direto a fresco de fluídos biológicos, cultura ou testes sorológicos, sendo que a sorologia revela a existência de anticorpos contra o microrganismo em um período de até 48 horas., contudo reações cruzadas com outras doenças fúngicas e parasitárias podem ocorrer (20,21). Testes histológicos e de imagem são de amplo uso no diagnóstico da doença (1,2).

O tratamento da PCM exige terapia medicamentosa prolongada para obtenção de um resultado bem-sucedido (22). Na forma crônica da doença o itraconazol é a droga de primeira escolha para o tratamento. Entretanto, o acesso ao itraconazol em regiões endêmicas é restrito devido ao custo do tratamento. Como alternativa, a combinação de sulfametoxazol com trimetoprima (Bactrim) é a opção mais barata e eficaz. Contudo, o uso de derivados azólicos oferece efeitos colaterais como sequelas fibróticas podendo levar à recidivas. De fato, uma das características do fungo é sua habilidade de iniciar uma infecção após um prolongado período de dormência, o que é comum em pacientes que viveram em áreas endêmicas com os primeiros sintomas aparecendo após várias décadas (1). Em formas mais avançadas, a anfotericina B é a melhor opção para o tratamento. Para evitar recidivas da doença, a terapia com as sulfonamidas é mantida por anos. A toxicidade da anfotericina B é bem conhecida, e tanto para ela quanto para as sulfonamidas, mesmo sob tratamento bem planejado, a carência de respostas, as recidivas e os óbitos ocorrem entre 15 a 30% (22). O uso de Anfotericina B lipossomal é uma alternativa para diminuir os efeitos colaterais, porém o custo é bem elevado (22).

O tratamento com corticosteróides em pacientes com formas graves e disseminadas é utilizado em associação com os antifúngicos com o objetivo de reduzir as intensas reações inflamatórias teciduais (23).

Dados *in vitro* mostraram a susceptibilidade de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* à nova classe de antifúngicos, equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina). O mecanismo de ação desta classe de antifúngicos está relacionada à composição de β -(1,3)-glucano presente na parede celular do fungo e induz mudanças físicas e deterioração citoplasmática em ambas as fases fúngicas (24).

1.1.2 *Paracoccidioides lutzii*

Os isolados de *P. brasiliensis* apresentam grande variabilidade genética. Em 2006, oito regiões gênicas que estão presentes em 5 diferentes loci no genoma do fungo foram escolhidas para tentar agrupar 65 isolados de *P. brasiliensis*. Baseados nesta análise, foi proposta a existência de 3 grupos filogenéticos distintos, sendo eles S1: grupo parafilético com 38 isolados da Argentina, Brasil, Peru e Venezuela e 1 isolado de pinguim da Antártida; PS2: grupo monofilético com 6 isolados, sendo 5 do Brasil e 1 da Venezuela; PS3: grupo monofilético com 21 isolados da Colômbia (25). Recentemente, foi criando um novo grupo monofilético PS4 que conta com isolados venezuelanos (26,27).

Em um estudo posterior, regiões codificantes e não codificantes de genes de *P. brasiliensis*, incluindo o gene da gp43, foram analisadas. Neste trabalho, foram avaliados mais 7 isolados que não estavam presentes nos estudos anteriores. A maioria dos isolados foi agrupada nos clados S1 e PS3, porém, o isolado Pb01 ficou separado dos outros grupos, na base do cladograma (28). Por fim, 13 “loci” gênicos foram analisados, a fim de comparar o isolado Pb01 com 122 isolados latino-americanos Pb01-like (29). O resultado foi a separação desses isolados em um grupo à parte dos grupos filogenéticos propostos por Matute e colaboradores (2006), os autores também observaram que poucos polimorfismos são compartilhados entre os isolados Pb01-like e os grupos S1, PS2 e PS3, sugerindo um isolamento reprodutivo entre esses isolados. Estima-se que o grupo monofilético Pb01-like foi separado dos grupos S1, PS2 e PS3 há, aproximadamente, 30 milhões de anos atrás. Baseados nestes dados, os autores propuseram uma nova classificação para os isolados Pb01-like, colocando-os como uma nova espécie dentro do gênero, denominada *Paracoccidioides lutzii*. O grupo

Pb01-like é endêmico nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil (Rondônia, Mato Grosso e Goiás) e compartilha algumas áreas geográficas com o grupo S1 (29).

1.1.3 Imunologia da PCM

O estabelecimento da doença, sua disseminação e gravidade, além de estarem relacionados ao próprio fungo, como sua virulência, composição antigênica e até condições ambientais, dependem muito dos fatores ligados ao próprio hospedeiro na sua capacidade de desenvolver ou não uma resposta imune eficaz. Indivíduos saudáveis que foram infectados com *P. brasiliensis* podem resolver a infecção a partir de uma eficiente resposta imune inata e do desenvolvimento do padrão de resposta Th₁, com formação de granulomas organizados e produção de IFN- γ e IL-2 (19). A polarização para outros padrões de respostas imunológicas como, por exemplo, Th₂, onde há altos níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β resulta em uma ineficiente ação imunológica capaz de conter a propagação da infecção resultando no surgimento das formas clínicas (30). A importância de citocinas na progressão da PCM vem sendo observada em vários estudos. Em um trabalho realizados com células mononucleares de pacientes com PCM, observou-se que o nível de IFN- γ nos indivíduos com a forma aguda da doença era baixo, e havia o predomínio de citocinas Th₂ e também, um aumento do nível de anticorpos, não protetores. O nível desses anticorpos diminui à medida que se institui a terapia (31).

Modelos animais mostraram que o IFN- γ desempenha um papel crucial na resistência ao *P. brasiliensis* e, juntamente com os macrófagos, tem um efeito fungicida (31). Altos níveis de IL-18, foram associados a pacientes com a forma juvenil da doença, quando comparados aos indivíduos com a forma crônica e com grupo controle. Esta citocina juntamente com o TNF- α pode ser útil como marcador da atividade e severidade e também um importante modulador da resposta adaptativa do hospedeiro (32)

Assim como as citocinas, células desempenha um papel essencial na defesa do hospedeiro contra a infecção por *P. brasiliensis*, ao passo que níveis elevados de

anticorpos específicos e a ativação policlonal das células B estão associados com as formas mais graves da doença (33).

Vários tipos celulares possuem um papel importante na resistência à doença; dentre elas destacam-se as células NK, neutrófilos, monócitos e macrófagos. A participação destas células na reação inflamatória e na atividade fungicida são induzidas, diretamente, pelo fungo e, indiretamente por citocinas produzidas pelas células do hospedeiro (34).

As células NK foram estudadas no sangue periférico de pacientes com a PCM e no modelo experimental em hamster. Estas células apresentam atividade citotóxica diminuída quando se tem a doença, sugerindo distúrbio imunológico associado à depressão da imunidade celular, tanto em pacientes quanto no modelo experimental (35).

Os neutrófilos exercem um importante papel imunoprotetor na fase inicial da defesa, mas deve-se resaltar que dependendo dos padrões genéticos do hospedeiro podem apresentar um papel imunoprotetor ou imunoregulador. Em camundongos suscetíveis à PCM (B10.A), a depleção dos neutrófilos resultou em um aumento nos níveis de anticorpos IgG1, IgA e IgG3 relacionados com a secreção de IL-4, TGF- β e IFN- γ , respectivamente. Já em animais resistentes (A/J) houve a produção de altos títulos de IgG2a, IgG3 e IgG2b, os quais são isotipos Th₁ ou IFN-reguladores. Desta forma os neutrófilos são fundamentais em situações onde a imunidade mediada por células está debilitada (36). Na última década, uma nova estratégia de defesa dos neutrófilos foi descrita, as armadilhas extracelulares de neutrófilos (neutrophil extracellular traps – NETs) (37). Estas estruturas são produzidas após a ativação celular e são compostas de cromatina descondensada complexada com diferentes proteínas citoplasmáticas, tais como histonas, bem como mais de 30 proteínas neutrófilas diferentes (37–39). Já há relatos do aparecimentos de NETs em lesões de pacientes com PCM (40). Além disso, foi sugerido que as proteínas presentes nas estruturas da NET podem ter um efeito fungistático contra leveduras de *P. brasiliensis*, possivelmente por sequestro de ferro ou cálcio (41).

Outras células que desempenham um papel importante na resposta à infecção por *P. brasiliensis* são os monócitos e macrófagos, sendo a ativação destas células um

dos primeiros eventos da resposta imune inata para combater o fungo. Esta ativação é induzida pelo reconhecimento de componentes extracelulares do fungo por alguns dos receptores de reconhecimento padrão (42). Também é possível ativar os macrófagos por ação do IFN- γ , o qual induz um aumento na produção de óxido nítrico e outros óxidos nitrogenados induzidos pelo óxido nítrico sintetase, potencializando assim a atividade microbicida dos macrófagos. O papel do óxido nítrico no controle da infecção por *P. brasiliensis* é importante tanto na fase micelial (43) quanto na fase leveduriforme em modelo *in vivo* (44). No entanto o papel do óxido nítrico na PCM permanece controverso, já que a produção excessiva de óxido nítrico pode estar relacionada com susceptibilidade no processo de infecção (45).

As células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígeno e recentes estudos experimentais têm demonstrado que a infecção com o *P. brasiliensis* ativa estas células a migrar para a região dos nódulos linfáticos, providenciando o primeiro contato para a posterior ativação de uma resposta do tipo Th₁ (46).

Células T regulatórias com fenótipo CD4⁺ CD25⁺ (Treg) também são importantes no controle da resposta imune. Foi observado que a ausência destas células está associada à exacerbação da resposta inflamatória e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Por outro lado, a ativação excessiva pode estar associada à susceptibilidade aos patógenos (47). A resposta Th₁₇ aparentemente é importante para o controle da PCM, uma vez que predomina nas formas mais brandas e localizadas, exercendo um papel similar àquele observado em outras infecções fúngicas, induzindo uma resposta inflamatória local e ativando células do sistema imunológico inato (48,49). Em um estudo feito em camundongos onde células T CD8⁺ foram depletadas, a doença se mostrou mais severa, destacando a importância das células T CD8⁺ na PCM (50).

1.1.4 A criptococcose

Leveduras do gênero *Cryptococcus* são patogênicas e capazes de infectar vários órgãos do corpo humano, atingindo principalmente o cérebro, levando ao quadro mais severo da doença, a meningoencefalite (51). Uma das mais importantes características da levedura é a presença de uma cápsula polissacarídica que envolve as células. Esta

cápsula apresenta funções associadas à virulência, resistência. A classificação sorotípica divide a espécie *C. neoformans* em sorotipo A (*C. neoformans* var. *grubii*), sorotipo D (*C. neoformans* var. *neoformans*) e ainda um híbrido AD e a espécie *C. gattii* encontra-se dividida em sorotipos B e C (52). Além da divisão sorotípica, as espécies patogênicas apresentam diferentes tipos moleculares. *C. neoformans* é classificado como AFLP1/VNI e AFLP1A/VNII (correspondente ao sorotipo A), AFLP3/VNIII (correspondente ao híbrido) e AFLP2/VNIV (correspondente ao sorotipo D). Enquanto que *C. gattii* compreende os tipos moleculares AFLP1/VGI, AFLP6/VGII, AFLP5/VGIII e AFLP7/AFLP10/VGIV (correspondente ao sorotipo B) (53). A diferença entre os tipos moleculares pode estar associada às diferenças de sensibilidade das cepas aos antifúngicos (53).

Este fungo possui distribuição mundial e é encontrado em diversos habitats sendo frequentemente isolado no solo e em excretas de pombos (54) e em árvores (55). As principais espécies do gênero *Cryptococcus* causadoras de doenças, em seres humanos, são *C. neoformans* e *C. gattii*. *C. neoformans* acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, sendo considerado um patógeno oportunista. Em contrapartida, *C. gattii* acomete, majoritariamente, pacientes imunocompetentes, sendo considerado um patógeno primário (56).

A criptococose é considerada um problema de saúde pública pois ocorre tanto em pacientes imunocomprometidos quanto imunocompetentes. No período de 1996 a 2006 das 3583 mortes por micoses sistêmicas 24.5% foi por criptococose. Dentre os pacientes HIV positivos a criptococose foi a mais frequente (17). Anualmente, em torno de um milhão de pessoas infectadas pelo HIV apresentam quadros de criptococose e que destes, aproximadamente, 600.000 vão à óbito em todo o planeta (57).

A infecção ocorre através da inalação de leveduras (58), assim como de leveduras dissecadas na natureza. Estas partículas inaladas depositam-se nos alvéolos pulmonares colonizando o trato respiratório e não causando sintomas, gerando uma forma latente da infecção, sem sintomatologia aparente. Entretanto, em quadros de comprometimento da imunidade, a forma dormente pode se tornar ativa e disseminar por via hematogênica, causando a infecção sistêmica (59). Outras formas de infecção já

foram documentadas, como, por exemplo, infecção gastrointestinal ou cutânea, porém a forma mais conhecida é através da inalação (60).

Para atingir o sistema nervoso central e causar meningite, a célula fúngica precisa atravessar a barreira hematoencefálica. Existem 3 mecanismos pelo qual a levedura atravessa a barreira e invade o cérebro: Modelo transcelular, no qual as células da levedura aderem-se e atravessam as células endoteliais microvasculares do cérebro sem causar danos à morfologia e integridade destas células (61); Modelo paracelular, no qual pode ser utilizado pelo patógeno, embora poucas evidências demonstrem o uso dele pela levedura. Neste modelo, as células da levedura degradam a proteína transmembrana das junções entre as células epiteliais e atravessam a barreira hematoencefálica causando mudança morfológicas nas células do hospedeiro(62); Modelo cavalo de Tróia, no qual a levedura consegue atingir o cérebro através de fagócitos mononucleares que fagocitam a levedura, transportando o fungo através a barreira hematoencefálica, não expondo as células de *Cryptococcus* sp. ao sistema imune (63).

O tratamento da criptococose ainda depende de um pequeno repertório de antifúngicos na qual resulta em longos tempos de tratamento, além de não ser muito eficaz. Se inicia o tratamento da criptococose com a associação de anfotericina B e 5-fluocitosina. Entretanto, no Brasil, não há comercialização da fluocitosina (64,65). A etapa seguinte do tratamento é a administração de azóis, sendo o fluconazol o fármaco de primeira escolha, Em seguida, inicia-se a terapia de manutenção com fluconazol em doses menores (64,65). Em casos de tratamento de infecção pulmonar, é comum a substituição do fluconazol por itraconazol. Porém o fluconazol não é indicado para tratamento de infecções do sistema nervoso central, uma vez que não apresenta capacidade de penetração na barreira hemato encefálica. Como alternativa em casos de meningite administra-se voriconazol, que apresenta eficiência no combate a proliferação fúngica e atinge o nível terapêutico adequado no líquido cefalorraquidiano (64)

1.1.5 Imunologia da criptococose

Cryptococcus spp. apresenta-se inerte ao ataque de citocinas pró-inflamatórias, o que gera mascaramento imunológico da levedura. Na infecção, em um primeiro momento, há aumento da liberação dos polissacarídeos capsulares como glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), o que reduz diretamente a inflamação por meio da supressão da via celular de fator pró-inflamatório (NF- κ B) e redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α). Ainda há o bloqueio da maturação de células dendríticas pela levedura, reduzindo a capacidade de apresentação da mesma como antígeno, por inibição de interleucinas (IL-12 e IL-23) (55). Além dos polissacarídeos capsulares, *Cryptococcus* spp. possui outros fatores de virulência, como as enzimas urease e fenoxidase, que reforçam o escape ao ataque do sistema imune, por favorecerem a sobrevivência da levedura no interior de macrófagos (55). A infecção, *Cryptococcus* spp. pode alterar a morfologia pelo aumento de suas células, formando as chamadas células gigantes e ainda pode secretar moléculas microbianas com padrões moleculares associados a patógenos, as quais podem ser componentes da parede celular ou da cápsula (55). As células gigantes reduzem o reconhecimento da levedura pelo sistema imunológico, por meio de indução da resposta de Th₂, a qual não é capaz de controlar a infecção (66). Além disso, *C. neoformans* possui a habilidade de realizar exocitose de dentro dos macrófagos, assim se evadindo. Todavia, os mecanismos que a levedura possui para fazer a exocitose ainda são poucos conhecidos (67).

As células CD4⁺ tem um importante papel no recrutamento de macrófagos e são as principais populações de células não funcionais em pacientes HIV positivo, o que os torna suscetíveis à criptococose. As células CD8⁺ também contribuem para imunidade protetora mediada por células contra infecções de *C. neoformans*. Essas células são importantes para o recrutamento de células efetoras e secreção de IFN- γ (68).

Os macrófagos apresentam um papel fundamental. A ativação de células T CD4⁺ leva a produção de citocinas do tipo Th₁, como IFN- γ . A presença destas citocinas gera macrófagos classicamente ativados que aumentam sua atividade contra *Cryptococcus* spp. e mantêm a infecção sob controle. Em algumas ocasiões, entretanto, os

macrófagos são expostos principalmente a citocinas do tipo Th_2 , como IL-4 e IL-13. Nesta situação, são gerados os macrófagos alternativamente ativados, cuja atividade antifúngica é insuficiente para controlar a replicação do fungo, o que resulta em uma infecção exacerbada. A resposta imune mediada por células Th_{17} é pouco caracterizada, porém, foi demonstrado que ela consegue prevenir a criptococose, uma vez que ativa macrófagos e evita a proliferação intracelular da levedura (69).

Os anticorpos são outro fator importante na resposta imune contra *Cryptococcus* spp. Foram produzidos os primeiros anticorpos monoclonais contra a GXM da cápsula, o principal polissacarídeo. (70–73). Alguns desses anticorpos protegeram camundongos de infecções letais, sendo propostos como alternativa terapêutica contra a doença (74). O mecanismo de proteção destes anticorpos inclui fixação de complemento na superfície do fungo, opsonização e toxicidade celular mediada por anticorpos (75).

1.1.6 Vacinas para paracoccidoidomicose e criptococose

A utilização de vacinas terapêuticas poderia melhorar a eficiência da quimioterapia e encurtar os períodos de tratamento. A aplicação de vacinas contra fungos patogênicos tem sido estudada para o tratamento de diversas infecções, tais como candidíase, aspergilose e criptococose, entre outras (76).

No caso da PCM, a maioria dos estudos se concentram no peptídeo P10. Este peptídeo possui 15 aminoácidos e é o epitopo imunodominante da gp43. O efeito protetor do P10 está relacionado em induzir uma resposta imune do tipo Th_1 dependente de $IFN-\gamma$ (77). Camundongos de linhagens isogênicas, ao serem imunizados com P10, desenvolveram uma infecção pulmonar 200 vezes menos intensa do que os animais controle (77). Análise através do programa TEPITOPE, que verifica a probabilidade de HLA-DR de caucasianos reconhecerem diferentes peptídeos, demonstrou que o P10 é um peptídeo promíscuo, sendo um importante candidato vacinal para ser utilizado em humanos (78). O P10, quando associado às drogas comumente utilizadas no tratamento da paracoccidoidomicose, apresenta um efeito aditivo no modelo experimental utilizando camundongos BALB/c, o que demonstra a capacidade do peptídeo P10 em auxiliar na diminuição do tempo de tratamento desta micose (79). A associação do P10 com adjuvantes como CFA (77,80), alumínio, MPLA

(79), flagelina (81), nanopartículas de PLGA (82) e lipídeo catiônico dioctadecyl-dimethylammonium bromide “DODAB” (83) mostram uma redução significativa da carga fúngica em pulmões de camundongos infectados *i.t.* com *P. brasiliensis*, sendo promissores para o tratamento da PCM experimental. Além disso, células dendríticas pulsadas com P10 apresentam um alto potencial na indução da vacinação devido a capacidade de rápida proteção contra o desenvolvimento da PCM, assim como no tratamento da doença estabelecida. Em camundongos, a administração de células dendríticas pulsadas com o peptídeo antes (via subcutânea) e depois (via subcutânea e intravenosa) da infecção intratraqueal com *P. brasiliensis*, diminui a carga fúngica nos pulmões. E os níveis de IFN- γ e IL-12 foram incrementados ao mesmo tempo que houve uma redução na produção de IL-10 e IL-4, em comparação com os grupos de animais não imunizados e àqueles que não foram tratados com as células pulsadas (84).

A utilização total da glicoproteína de 43 kDa, gp43, foi investigada. Esta glicoproteína é considerada o principal antígeno utilizado para o diagnóstico sorológico da PCM, sendo reconhecida por aproximadamente 100% dos soros de pacientes infectados com *P. brasiliensis*, possibilitando imunodiagnósticos altamente sensíveis e específicos (85–89). Esta glicoproteína é expressa de forma constitutiva nas fases micelial e leveduriforme do fungo (90), sendo constituída por uma única cadeia de oligossacarídeos, (91) e está caracterizada bioquimicamente (87). Além disso, essa glicoproteína liga-se a elementos da matriz extracelular, como a laminina, explicando desta forma sua participação no processo de adesão de células leveduriformes à células epiteliais, com consequente invasão e destruição dos tecidos do hospedeiro (92). Estudos experimentais mostraram que gp43 pode inibir a fagocitose *in vitro* do fungo, por macrófagos peritoneais de camundongos. Baseado nessas observações, é sugerido que a gp43 medeia um mecanismo de escape do fungo, o que facilita o estabelecimento da infecção primária em hospedeiro susceptível (93,94). A gp43 possui 416 aminoácidos, dentre os quais há epitopos que estimulam a proliferação de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th₁ em indivíduos infectados, sendo responsáveis pelas reações positivas nos testes de hipersensibilidade tardia (HTT) para PCM (95).

A transferência passiva utilizando anticorpos monoclonais específicos para antígenos de *P. brasiliensis* também se mostra promissora. A transferência passiva de anticorpos monoclonais contra a gp70 (antígeno reconhecido por 96% dos soros de pacientes com PCM) previamente à infecção com *P. brasiliensis*, aboliu a infecção pulmonar em camundongos (96). Proteção semelhante foi observada com o anticorpo monoclonal (3E) contra gp43, cuja administração antes e após a infecção mostrou resultados expressivos.

Estudos em modelos experimentais de PCM mostraram que leveduras de *P. brasiliensis* radio atenuadas podem ser utilizadas como um possível tratamento. A imunização com as leveduras apresentou eficácia na diminuição do crescimento fúngico nos pulmões dos animais infectados assim como estimulou a secreção de citocinas do padrão Th₁ (97). Resultados protetores similares também foram observado com Imunizações de paracoccina recombinante (98).

Foi desenvolvida uma vacina de DNA que codifica a proteína de 27 kDa (rPB27) que está presente na superfície celular de *P. brasiliensis*. O estudo vacinal realizado em animais revelou que após 40 dias de tratamento com a vacina em combinação com fluconazol houve um controle do crescimento do fungo nos pulmões, fígado e baço (99). Também, foi observado que animais imunizados com esta vacina apresentou baixos níveis de colágeno e do receptor CCR7 e altos níveis de IFN- γ , TGF- β e IL-10 no pulmão, isso contribui para diminuição de fibrose (100).

O desenvolvimento de uma vacina contra *C. neoformans* se mostra muito progressivo ao longo dos últimos anos. A descoberta de um anticorpo monoclonal contra o polissacarídeo capsular, que habitualmente é imunogênico, conjugado com toxóide tetânico, tem recebido grande atenção e tem levado a rápidos avanços no campo (101). Camundongos foram imunizados com GXM conjugado com toxóide tetânico e foi observado que o conjugado estimulou a produção de anticorpos com a mesma especificidade que os anticorpos gerados durante a infecção ativa. Este achado sugere que o conjugado pode ser útil para a vacinação (102).

Esses anticorpos monoclonais para GXM não apresentam toxicidade para as células fúngicas. Em vez disso, eles podem mediar proteção, aumentando a eficácia das células efetoras do hospedeiro contra *C. neoformans*. Ao promover anticorpos

específicos, a resposta inflamatória pode ser melhorada pela promoção da fagocitose e, conseqüentemente, a apresentação de antígenos, a expressão de moléculas co-estimulatórias e modulação a produção de citocinas também torna-se mais eficaz (101,102)

Um peptídeo mimético do GXM (P13) foi proposto como antígeno para vacinas contra patógenos encapsulados. O peptídeo P13 foi conjugado ao toxóide tetânico e toxóide diftérico foi administrado por via subcutânea em camundongos transgênicos que produzem anticorpos humanos. Os resultados mostraram que ambas formulações do peptídeo foram antigênicas. Adicionalmente, o peptídeo provocou uma resposta de anticorpos humanos com expressão de imunoglobulina humana nos ratos transgênicos. Portanto, o peptídeo mimético pode ser promissor para o tratamento de infecções por *C. neoformans* (103).

Um heptassacarídeo correspondente a um imunodominante do GXM foi produzido e uma forte reação com dois diferentes anticorpos monoclonais IgM para GXM foi obtido. O heptassacarídeo foi conjugado com albumina de soro humano resultando num complexo que provocou reações de IgG de altos títulos em camundongos administrado com adjuvante de Freund. Além disso, um peptídeo mimético de um epítipo GXM foi isolado de anticorpo monoclonais humanos. Este peptídeo associado a toxóide tetânico suscitou resposta de anticorpos protetores (104).

As vacinas, sejam elas terapêuticas, profiláticas ou pela transferência passiva de anticorpos são importantes ferramentas associadas ou não ao tratamento medicamentoso das micoses sistêmicas. Até o momento não há vacina licenciada, em todo o mundo, para micoses sistêmicas endêmicas e estudos complementares são essenciais para em um futuro próximo tornarem realidade.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral e justificativa

O fato de os isolados de *Paracoccidioides* Pb01 e Pb18 pertencerem a grupos filogenéticos distintos sugere que as abordagens para identificação do fungo, diagnóstico sorológico e desenvolvimento de vacinas baseados somente na gp43 e no seu epitopo imunoprotetor P10 podem não ser efetivas para todos os isolados. Recentemente, foi demonstrado que no isolado Pb01 de *P. lutzii* a região correspondente ao P10 de *P. brasiliensis*, apresenta importante mutação no core do peptídeo o que poderia extinguir a capacidade protetora (105). Para determinação de novos epitopos com potencial vacinal para *P. lutzii*, optamos por analisar peptídeos apresentados pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade de células apresentadoras de antígeno após fagocitar/internalizar partículas fúngicas e/ou exoantígenos.

A análise dos peptídeos foi realizada sob supervisão do Prof. Arturo Casadevall na Johns Hopkins University, que demonstrou grande interesse pelo projeto. A principal linha de investigação do laboratório do Dr. Casadevall é em criptococose e por sugestão em ambos grupos envolvidos, os experimentos com *Paracoccidioides lutzii* e *Cryptococcus neoformans* e *gattii* foram realizados em paralelo. A criptococose é a segunda causa de mortes no Brasil, entre pacientes infectados por fungos, que foram a óbito como causa primária e a primeira causa de óbito, entre as infecções fúngicas, em pacientes com AIDS.

Neste contexto, o nosso estudo visa ampliar o conhecimento e novas ferramentas para desenvolvimento de vacinas terapêuticas.

1.2.2 Específicos

- Elaborar um sistema onde há produção de antígenos tanto de parede celular quanto no sobrenadante de cultura de *Paracoccidioides* spp..
- Extrair e purificar exoantígenos e antígenos da parede celular de *Paracoccidioides lutzii*.

- Observar se os antígenos e exoantígenos possui a capacidade de induzir uma resposta celular e ou humoral.
- Desenvolver e aperfeiçoar um sistema onde é possível mapear epitopos, em um contexto natural utilizando macrófagos primários e técnicas imuno–proteômicas.
- Mapear e caracterizar os epitopos de *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides lutzii*.

1.3 Materiais e métodos

1.3.1 Fungos

Isolados Pb01, ED01, 1578 e 66 de *P. lutzii* e o isolado 339 de *P. brasiliensis*, foram mantidos em sua fase leveduriforme em meio ágar Fava Netto à 37 °C, com realização de repiques quinzenais. Isolados K99 e o mutante CAP59 (sem cápsula) de *C. neoformans* e R265 de *C. gatii* foram mantidos em meio Sabouraud Dextrose Agar à 37 °C, com realização de repiques quinzenais.

1.3.2 Obtenção do exoantígeno de leveduras de *Paracoccidioides* spp.

Entre 2 e 6 gramas de massa fúngica foi adicionada em 500 mL de meio Fava Netto ou Meio Nutritivo de Ham (F-12) acrescido de 1.5% de glicose à 37°C sob agitação (100 rpm) durante 7 ou 15 dias. Após o tempo de crescimento o sobrenadante foi separado da massa celular por centrifugação a 3500 rpm por 10 min (Sorvall, modelo Biofuge Primo R) e subsequentemente a uma filtração a 0,22 µm. Os sobrenadantes foram concentrados por liofilização. O teor de proteínas do liofilizado foi determinado pelo método de Bradford e o conteúdo protéico foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida-duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12%. Os padrões de massa molecular utilizados foram: Low Range (BIO-RAD) e Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare).

1.3.3 Extração de antígeno de parede *Paracoccidioides* spp.

Entre 2 e 6 gramas de massa fúngica foi crescida em 500 mL de meio Fava Netto ou Meio Nutritivo de Ham (F-12) acrescido de 1.5% de glicose à 37 °C sob agitação (100 RPM) durante 7 e 15 dias à 37 °C. Após o período de incubação os isolados foram lavados três vezes em tampão Tris-HCL 25 mM, pH 8,5 gelado e depois incubados com 2 mM Ditioneitol (DTT) preparado em Tris-HCL 25 mM, pH8,5, suplementado com 1 mM PMSF, a 4 °C por 120 min sob agitação branda. Os extratos proteicos foram dialisados e liofilizados e ressuspensos em água.

1.3.4 Western Blot

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE 12% e transferidas, durante 90 min a 100 mV, para membrana de PVDF utilizando um tampão de transferência contendo 0,03 M de Tris, 0,2 M de glicina e 20% de metanol, diluídos em um volume final de 1 L de água destilada. Após a transferência, as proteínas presentes na membrana foram visualizadas com uma solução de corante *Ponceau*. Em seguida, a membrana foi bloqueada com PBS-T com 5% de leite pH 7,4 (0,05 M de Tris base, 0,15 M de NaCl, 0,1% de Tween), *overnight*, a 4 °C. Foram realizadas 3 lavagens com PBS-T, sob agitação, e em seguida, a membrana foi incubada com soro policlonal de camundongos infectados com Pb01, na diluição de 1:150 em PBS-T com 1% de leite por 60 min. A reação foi detectada por ECL Western Blotting System (Ge healthcare). O padrão de massa molecular utilizado foi o *Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range* (BIO-RAD).

1.3.5 Obtenção de soro policlonal de camundongos infectados com *P. lutzii*

Camundongos BALB/c foram infectados com leveduras de *Paracoccidioides* Pb01 por duas vias: 1) intraperitoneal com 10^7 leveduras em um volume final de 300 μ L em PBS; 2) intratraqueal com 10^6 leveduras em um volume final de 50 μ L em PBS. O procedimento para infecção intratraqueal foi realizado conforme descrito previamente (106) e com os animais devidamente anestesiados com uma solução contendo 80 mg/kg de ketamina (União Química, Brasil) e 10 mg/kg de xilazina (União Química, Brasil). Após 30 dias de infecção o sangue coletado foi mantido a 37 °C por 30 min e a 4 °C por 40 min, e depois centrifugado a 3000 x g por 15 min. Os soros foram coletados e mantidos a -20 °C.

1.3.6 Cromatografia de gel filtração

Uma alíquota de 300 μ L das extrações de parede e do exoantígeno foram aplicadas em uma coluna de gel filtração (0,1 x 30 cm) Superose 6 10/300 GL (Thermo, EUA) pré-equilibrada com acetato de amônio 50mM. Esta técnica baseia-se na

separação pela diferença de tamanho de moléculas em uma solução através da passagem destas por uma matriz cromatográfica. O fluxo utilizado foi de aproximadamente 1 mL/min. Frações de 1,0 mL foram coletadas. Todas as frações foram submetidas a dot-blot, utilizando o soro policlonal dos camundongos infectados com Pb01.

1.3.7 Preparação das amostras para análise por espectrometria de massas

As frações oriundas da cromatografia de gel filtração que foram positivas no dot-blot foram preparadas para serem aplicadas no espectrômetro de massa pela seguinte maneira. Um volume de 50 µL da fração foi concentrada em speed vac (Eppendorf, EUA) e depois foi ressuspensa em 20 µL de 0,4 M de bicarbonato de amônia e 8 M de ureia. Posteriormente, foi adicionado 5 µL de 0,045 M de DTT e incubado por 15 min a 50 °C. Após esfriar a temperatura ambiente, foi adicionado 5 µL de 0,1 M de iodoacetamida e incubado por 15 min em temperatura ambiente, protegido da luz. Após a incubação, foi adicionado 2 µL tripsina e 130 µL de água ultrapura, para diluir a ureia em 1 M. A solução foi incubada por 24 horas, e depois foi feita uma cromatografia de fase reversa, utilizando uma micro coluna C18 (zip-tip) de acordo com o fabricante.

1.3.8 Análise dos peptídeos por espectrometria de massas

Os peptídeos foram ressuspensos em 20 µL em ACN/H₂O 1:1 com ácido fórmico 0,1% e submetidos a análise por infusão direta sob fluxo de 0,5 µL/min em uma seringa de 50 µL (Hamilton, Reno, NV, EUA). A fragmentação dos íons mono ou duplamente carregados foi realizada sob diferentes energias de colisão (Ecol) contra gás inerte (argônio) para que os melhores espectros de MS/MS pudessem ser utilizados no sequenciamento. Os espectros foram adquiridos a cada 0,5 segundo e a composição final de espectros foi obtida após 1,5 min de aquisição. Os espectros de DIC contra moléculas de gás inerte (Ar) foram deconvoluídos com a ferramenta MaxEnt3 (disponível no software MaxLynx 4.1) para que os íons com mais de uma carga fossem convertidos em monocarregados. As proteínas foram identificadas através da busca em banco de dados com os valores m/z dos peptídeos utilizando-se o

programa MASCOT (Matrix Science Inc., USA), com os seguintes parâmetros de busca: 0,08 Da para tolerância de massa isotópica; 0,02 Da para tolerância do fragmento de massa; oxidação por metionina ou metilcarboamina como possíveis modificações e permissão para perda de uma única clivagem triptica.

1.3.9 Cultura celulares

Macrófagos J774.16 foram mantidas em meio de cultura celular, DMEM com 10% de soro fetal bovino, 0,1% de 2-Mercaptoetanol, 10% de meio NCTC 109, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de solução de penicilina e estreptomicina, à 37 °C em 10% de CO₂.

Macrófagos primários foram isolados a partir da medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos. A medula óssea coletada foi ressuspendida em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, 0,1% de 2-Mercaptoetanol, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de solução de penicilina e estreptomicina, 1% de Glutamax, 1% de HEPES e 20% meio condicionado de células L929 (107). As células foram diferenciadas por 7 dias em placas de cultura de 150mm em um volume final de 25 mL de meio de cultura.

1.3.10 Ensaio de fagocitose e expressão de MHCII

A fagocitose e a expressão de MHCII foram realizadas utilizando citometria de fluxo. Macrófagos (1×10^6) foram adicionados em poços de placas de 6 orifícios em um volume final de 2 mL. As células foram ativadas com IFN- γ (100 U/mL) durante 12 horas. Após o tempo de ativação os fungos, previamente marcados com UVITEX 2B e mortos por alta temperatura (100 °C por 5 min), foram adicionados em uma proporção de 3 leveduras para cada macrófago. Para a marcação com UVITEX 2B, foi adicionado 1 μ L de uma solução de 10% de UVITEX 2B em PBS em 1×10^8 leveduras em um volume final de 1 mL. As leveduras foram incubadas por 1 min seguido de duas lavagens com PBS. Para a fagocitose dos isolados K99 e R265 foi utilizado o anticorpo 18B7 (74) e para os isolados Cap59 e Pb01 foi utilizado complemento de cobaia (MP biomedical, EUA). Após tempos determinados de fagocitose, as células foram lavadas

com PBS para retirar as leveduras que não foram fagocitadas e desprendidas da placa após a incubação de 5 min a 37 °C utilizando 500 µL de cellstripper (Corning, EUA). As células foram resuspensas em tubos de citometria onde foram marcadas com os seguintes anticorpos: BV650 - contra CD11b de camundongo (clone M170), PE – contra MHCII de camundongo (clone M5.114). As amostras foram incubadas por 30 min à 4 °C. Como marcação de viabilidade foi utilizado o reagente 7AAD (5 µL por amostra). O citômetro utilizado foi o BD LSRII (BD, EUA). Para a estratégia de seleção positivas, primeiramente as células positivas para CD11b foram selecionadas, depois células singulares foram selecionadas para subsequente seleção de células vivas e assim selecionando a população final. A população final consiste em macrófagos contendo leveduras, nas quais foram adquiridos 50000 eventos. A quantificação de MHCII foi baseada na medição da mediana de intensidade de fluorescência (MIF). Todos os experimentos foram feitos em três replicas biológicas e em triplicata.

1.3.11 Ensaio de proliferação de linfócitos

O equivalente de 10^7 leveduras, em um volume final de 100 µL de PBS, foi emulsificado com 100 µL de adjuvante incompleto de Freud (Sigma Aldrich Co., MO, EUA) e depois as leveduras foram injetadas na base da cauda de camundongos (100 µL). Após 7 dias os linfonodos inguinais foram coletados, macerados. Os linfócitos foram cultivados em meio, RPMI 1640; 10% de soro fetal bovino, 0,1% de 2-Mercaptoetanol, 1% de solução de penicilina e estreptomicina, 1% de HEPES e 1 mM de piruvato de sódio. Foi feita a fagocitose em placa de 96 poços como descrito no item 1.3.10. Macrófagos 3×10^5 em 100 µL de meio BMDM, as células foram infectadas com as leveduras em uma proporção de 3 leveduras para 1 macrófago. Após a fagocitose, as células foram lavadas e fixadas com 200 µL de paraformaldeído por 10 min à temperatura ambiente. As células foram lavadas e depois incubadas com 0,1 M de L-lisina por 15 min à 37 °C. Um volume de 200 µL com 5×10^5 de linfócitos, previamente marcados com CellTrace™ Far Red Cell Proliferation Kit (Thermo, EUA), foram adicionados a monocamada de macrófagos. Após 5 dias os linfócitos foram recolhidos e marcados com os anticorpos: PerCP - anti camundongo CD4 (clone RM4-5), BB515 - anti camundongo CD8a (clone 53-67), PE - anti camundongo (clone H57-597). As

amostras foram incubadas por 30 min à 4 °C. Como marcação de viabilidade foi utilizado o reagente LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (1 µL por mL). O citômetro utilizado foi o BD LSR II. Todos os experimentos foram feitos em três replicas biológicas e em triplicata.

1.3.12 Purificação e identificação de epítopos

No total de 10^9 macrófagos primários foram infectados em uma proporção de 3 leveduras para cada macrófago. Após 8 horas de fagocitose, as células foram lisadas por 1 hora à 4 °C em uma solução de 20 mM de Tris-HCL, 1% de CHAPS (Roche) acrescido de coquetel de inibidor de protease (complete, Roche), suplementado com 1 mM de PMSF e 0,1 mM de iodoacetamida, pH 8. Os debris celulares foram descartados após uma ultracentrifugação (21000 g) (108), o sobrenadante que contém o complexo MHC de classe II carregado com o peptídeo foi submetido a cromatografia de afinidade através de esférulas magnéticas conjugadas com Proteína G (Dynabeads Protein G Immunoprecipitation Kit - Thermo Fisher Scientific). As esférulas foram associadas com o anticorpo contra MHC de classe dois (MHCI) (clone M5-114, Biolegend, EUA) de camundongo. Os complexos MHCI mais peptídeos foram eluídos de acordo com o fabricante e peptídeos foram isolados utilizando tubos de filtração (30 kDa, Millipore). Os peptídeos purificados foram separados através de uma coluna C18 (Thermo) junto a um sistema de HPLC acoplado a um espectrômetro de massa (LTQ-Orbitrap XL, Thermo). A coluna foi equilibrada com 97% do solvente A (1% de acetonitrila, 0,2% de ácido fórmico em água) e 3% do solvente B (80% de acetonitrila, 0,2% de ácido fórmico em água). Os peptídeos foram eluídos utilizando o gradiente: 0-50min, 3-40% e 50-60 min, 50-97% em um fluxo de 1 mL/min em uma faixa de massa entre 300-2000 m/z. Os íons mais abundantes foram escolhidos para o sequenciamento em tandem (MS/MS) (108,109). As proteínas serão identificadas através da busca em banco de dados com os valores m/z dos peptídeos utilizando-se o programa MASCOT (Matrix Science Inc., USA), com os seguintes parâmetros de busca: 0,08 Da para tolerância de massa isotópica; 0,02 Da para tolerância de fragmento de massa; oxidação por metionina ou metilcarboamina como possíveis modificações e permissão para perda de uma única clivagem triptica.

1.3.13 Predição *in silico* de epítomos

A predição *in silico* foi realizada online utilizando o MHC-II *Binding Predictions* (<http://tools.iedb.org/mhcii/>) disponibilizado pelo *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (<http://www.iedb.org/>). Foram utilizados quatro métodos de predição (SMM-align, Network-based Neural-align e Consensus Approach) disponíveis para camundongos H-2-IAb - C57BL/6. Outra ferramenta utilizada foi o NetMHC 2.2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>)(alelo H-2-IAb) que utiliza o *Neural Network-based Alignment Algorithm* para predição da ligação do peptídeo ao MHC de classe II.

1.4 Resultados

1.4.1 Extração de exoantígenos de cultura de *Paracoccidioides* spp. e antígenos de parede celular de *Paracoccidioides* spp.

Foi realizado o cultivo dos isolados de *P. lutzii*: Pb01, 1578 e ED01, assim como do isolado Pb339 de *P. brasiliensis* em dois meios de cultura distintos (MMcM, e Fava Netto) a fim de comparar o perfil de proteínas produzidas pelos diferentes isolados. Os fungos foram cultivados durante 5, 10 e 15 dias, sob agitação à 37 °C e os sobrenadantes obtidos foram concentrados, dialisados contra água destilada e submetidos à eletroforese em SDS-PAGE 10%. Somente no período de 15 dias de cultivo foi possível detectar produção de proteínas (**Figura 1.1**). Nota-se que cada isolado de *P. lutzii* exibiu um perfil de expressão de proteínas peculiar. Entretanto, apesar da heterogeneidade na expressão de proteínas, todos isolados de *P. lutzii* e o isolado Pb339 de *P. brasiliensis* exibiram uma banda com aproximadamente 66 kDa em 15 dias de cultivo em meio Fava Netto. As demais condições de cultivo não apresentaram perfil de expressão de proteínas.

Após verificar que as condições de cultivo que proporcionava um perfil extenso de produção de proteínas, a próxima etapa foi a prospecção de antígenos utilizando a técnica de Western Blot, para isso utilizou-se a condição de cultivo de 15 dias em meio Fava Netto. A padronização do ensaio foi feita a partir de soros de 10 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 8 semanas de vida, onde 8 foram infectados intraperitonealmente e 2 intratraquealmente. As infecções distintas foram feitas para avaliar se o tipo de infecção interfere na produção de anticorpos. A **figura 1.2** mostra o resultado do Western Blot, pode-se observar que o tipo de infecção não alterou o perfil de produção de anticorpos dos camundongos. Além disso, há várias proteínas de massas moleculares entre 100-20 kDa, sendo que há uma banda de 66 kDa que é compartilhada por todas as amostras de soro. Portanto, todos os soros foram reunidos em um mesmo tubo dando um volume aproximado de 10 mL, para subsequente titulação. A diluição de 1:150 foi escolhida, pois se mostrou ideal para o ensaio.

Figura 1.1. Perfil de proteínas dos isolados de *P. lutzii* (Pb01, ED01, Pb1578) e de *P. brasiliensis* (isolado Pb339), cultivados em meio Fava Netto por 15 dias à 37 °C. Gel de poliacrilamida-SDS 10% corado com nitrato de prata. 1. Padrão de massa molecular em kDa; 2. Pb339; 3. Pb01; 4. ED01; 5. 1578.

Figura 1.2. Western Blot de uma amostra do concentrado de sobrenadante do cultivo em meio Fava Netto de 15 dias do isolados Pb01. Foram utilizados soros provenientes de 10 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c. As amostras entre a primeira e a oitava 8 foram infectadas com 10^7 leveduras de Pb01 pela via intraperitoneal, e da nona a décima os animais foram infectados com 10^6 leveduras pela via intratraqueal.

Após verificar as condições ideais para detectar proteínas imunogênicas de cultura de *Paracoccidioides* spp., foi feita a extração de proteínas de parede celular das leveduras (110). A **figura 1.3** mostra os antígenos de parede e os exoantígenos encontrados nas amostras de sobrenadante de cultura dos seguintes isolados: Pb01, ED01, 1578, 339 e 66. Tanto o perfil dos antígenos de parede quanto o perfil de exoantígenos varia de acordo com o isolado (**A, B e C**). Com relação aos antígenos de parede (**A e B**), pode-se observar 4 bandas que são presentes em todas as amostras analisadas. Estas bandas possuem 82, 66, 48 e 26 kDa respectivamente. Diferentemente, não houve algum exoantígeno que foi compartilhado entre os isolados (**C**). Entretanto, o exoantígeno de 66 kDa está presente nos isolados de Pb01, ED01 e 1578, em intensidades diferentes. O isolado 339 e 66 não apresentaram a banda (**C**).

A **figura 1.4** mostra os cromatogramas das corridas das amostras tanto de parede quanto de exoantígeno do isolado Pb01. Na amostra de exoantígeno (**A e B**) foi observado a 280 nm que há um grande pico que vai da fração 12 até a 20. Já a 214 nm há um pequeno pico entre as frações 7 e 8 seguido de um grande pico que cobre desde da fração 12 até a fração 20. Com relação as amostras de parede de 7 dias (**C e D**) e de 15 dias (**E e F**) foi visto a 280 nm um grande pico definido entre as frações 29 e 31 e a 214 nm há vários picos pequenos entre as frações 19 e 25 e um grande pico definido entre 29 e 31.

Todas as frações das três corridas foram submetidas a dot blot. O dot blot foi feito com soro de camundongos infectados com Pb01, este ensaio foi realizado com o objetivo de localizar em quais frações as proteínas imunogênicas de parede e os exoantígenos estavam localizados. A extração de exoantígeno se mostrou mais eficiente, pois a 214 nm há um pequeno pico entre as frações 7 e 8, ao passo que nas extrações de parede não há pico. Apesar da pequena quantidade, as frações se mostram positivas no dot blot (**Figura 1.5**).

O resultado do dot blot indica que as proteínas imunogênicas das amostras se encontram na faixa de 66 kDa. Portanto, essas frações foram submetidas a um processo de concentração por centricon com limite de 10 kDa para retirar o sal do tampão de corrida, e posteriormente concentração em speedvac. Embora as amostras foram previamente concentradas, a concentração de proteínas das amostras era muito

baixa girando em torno de 5 µg/ mL. Indicando que há uma grande perda de proteína quando as amostras foram submetidas à coluna. Contudo, Gel de SDS-Page foi realizado e com muita dificuldade foi verificado 2 bandas na região de 66 kDa (**Figura 1.6**). Apesar disso, as amostras foram preparadas e levadas para o espectrômetro de massa para identificação. Para isto, as sequências foram confrontadas com o banco de dados do genoma de *Paracoccidioides*, através do programa Mascot.

A **tabela 1.1** sumariza os resultados obtidos da identificação das proteínas. Para as análises do exoantígeno, foram identificadas duas proteínas somente na fração 7 e nenhuma foi identificada na fração 8. As proteínas encontradas foram Selenocisteína liase e exibe a massa de 53 kDa e uma beta quimaerina. Nas amostras de parede, foram encontradas duas proteínas. A proteína SEY 1 ligadora de GTP, que está presente nos tempos de 7 e 15 dias e uma proteína não caracterizada que está presente somente no tempo de 7 dias.

Figura 1.3. Western Blot de extração de antígeno de parede **(A)** 7 dias, **(B)** 15 dias e **(C)** exoantígeno de 15 dias de cultivo. Os isolados da espécie *lutzii*: Pb01, ED01, 1578 e 66 e da espécie *brasiliensis* 339 foram crescidos em meio Fava Netto à 37 °C.

Figura 1.4. Cromatografia de gel filtração de amostra de exoantígeno (**A 280nm e B 214nm**), de parede 7 dias (**C 280nm e D 214 nm**) e 15 dias (**E 280nm e F 214nm**). As corridas foram feitas em tampão PBS, pH 7,5 e o fluxo foi de 1mL por minuto. A corrida foi de 1 hora e foram coletadas 36 frações. A coluna utilizada foi a Superose 6 10/300 GL (0,1 x 30 cm).

Figura 1.5. Dot blot das frações oriundas da purificação das amostras de Pb01 de extração de parede de 7 dias **(A)** e 15 dias **(B)** e do exoantígeno **(C)**. O ensaio foi realizado com o soro de camundongos infectados com Pb01.

Figura 1.6. SDS-PAGE 10% das frações oriundas da coluna de gel filtração. A e B, Frações 7 e 8 da corrida do concentrado do meio de cultura. C, Fração 8 da corrida da extração de parede de 7 dias. D, fração 8 da corrida da extração de parede de 15 dias. O gel foi corado com prata.

Tabela 1.1. Identificação de sequências adquiridas por espectrometria de massas e confrontadas com o banco do genoma de *Paracoccidioides*.

Amostra	fração	Código Uni Prot	Nome	Massa kDa
Exoantígeno	7	PABG_05309	Paracoccidioides brasiliensis Pb03 selenocysteine lyase	53
		PABG_00384	Paracoccidioides brasiliensis Pb03 beta-chimaerin	124
Exoantígeno	8			
Antígeno de parede 7 dias	8	PADG_01945	Paracoccidioides brasiliensis Pb18 GTP-binding protein Sey1	98
		PADG_01752	Paracoccidioides brasiliensis Pb18 conserved hypothetical protein	33
Antígeno de parede 15 dias	8	PADG_01752	Paracoccidioides brasiliensis Pb18 conserved hypothetical protein	33

1.4.2 Extração de exoantígenos de cultura de *Paracoccidioides* spp. e antígenos de parede celular de *Paracoccidioides* spp. utilizando o meio F12

A **Figura 1.7** mostra o perfil de proteínas da extração de parede e do concentrado de meio de cultura, utilizou-se o meio F-12 para o cultivo de Pb01 no tempo de 7 dias à 37 °C. Pode-se observar que tanto na extração de parede quanto no concentrado de meio de cultura há perfis de proteínas distintos. A extração de parede apresenta proteínas que varia entre 97 kDa a 31 kDa, sendo que a maioria das proteínas possuem a mesma quantidade. Entretanto, o concentrado de meio de cultura apresenta poucas proteínas em relação a extração de parede, contudo, pode-se observar que há proteína majoritárias na região entre 97 kDa e 45 kDa. Apesar disso, em um SDS-PAGE de 15%, feito para observar proteínas de baixo peso molecular, foi visto que a amostra do concentrado de cultura apresenta proteínas de baixo peso em altas quantidades. Isso não aconteceu com a amostra de extração de parede (**Figura 1.8**).

Por conseguinte, foi feita a prospecção de antígenos nas duas amostras. A **Figura 9** mostra o western blot realizado com as amostras de extração de parede e do concentrado de meio de cultura. Foi observado que na amostra de extração de parede há pelo menos 8 proteínas reativas ao soro de camundongos infectados com Pb01. Os tamanhos destes antígenos variam em torno de 110 a 41 kDa. Por outro lado, a amostra de concentrado de cultura revelou apenas duas bandas muito fracas relativas a dois antígenos de aproximadamente 80 kDa e 50 kDa.

Figura 1.7. Perfil de proteínas do isolado Pb01 de *P. lutzii* cultivado em meio F-12 por 7 dias a 37 °C. Gel de poliacrilamida-SDS 10% corado com coomassie blue. **A**, Concentrado do meio de cultura. **B**, extração proteica de parede.

Figura 1.8. Perfil de proteínas do isolado Pb01 de *P. lutzii* cultivado em meio F-12 por 7 dias à 37 °C. Gel de poliacrilamida-SDS 15% corado com coomassie blue. **A**, Concentrado do meio de cultura. **B**, extração proteica de parede.

Figura 1.9. Western Blot do concentrado de meio de cultura F-12 **(A)** e extração de parede **(B)**. O isolado Pb01 foi cultivado em meio F-12 por 7 dias à 37°C.

1.4.3 Fagocitose e expressão de MHCII de macrófagos

Para este ensaio, J774.16, macrófagos primários, os isolados K99, Cap59, R265 e Pb01 foram utilizados. Tanto a fagocitose quanto a expressão de MHCII na superfície dos macrófagos foram avaliadas por citometria de fluxo. **Nas figuras 1.10** pode-se observar a estratégia de seleção positiva utilizada em todas as análises.

A **figura 1.11** apresenta as porcentagens de fagocitose de macrófagos que fagocitaram leveduras de *Cryptococcus* spp. e *P. lutzii*. No tempo de 4 e 8 horas, com exceção de Cap59 houve uma fagocitose de mais de 50% para os macrófagos J774.16. Para macrófagos primários o perfil foi diferente tanto para 4 e 8 horas houve uma fagocitose maior que 50% para todos os grupos.

A expressão de MHCII variou de acordo com macrófago utilizado (**Figura 1.12**). Na linhagem J774.16, tanto para 4 ou 8 horas, a expressão de MHCII de todos os grupos foram diferentes do controle. Entretanto o isolado Cap59 provocou a expressão de maior quantidade de moléculas de MHCII na superfície celular. Os isolados K99 e R265 apresentaram a mesma quantidade de expressão de MHCII. Macrófagos J774.16 que fagocitaram leveduras de Pb01 também expressaram mais moléculas de MHCII comparado com controle, aproximadamente duas vezes mais.

Figura 1.10. Estratégia de seleção positiva utilizada nas análises de fagocitose e expressão de MHCII de macrófagos que fagocitaram leveduras de Pb01 e *Cryptococcus* spp. **SSC-A** (área de Side scatter), **FSC-H** (altura de forward scatter), **SSC-W** (largura de Side scatter), **CD11b** (marcador de macrófago) **UVITEX 2B** (marcador de fungo) e **7AAD** (marcador de viabilidade).

Figura 1.11. Porcentagens de fagocitose e J774.16 **(A)** e macrófagos primários **(B)**. A fagocitose ocorreu nos tempos de 4 horas e 8 horas à 37 °C em 10% de CO₂. Foram utilizadas Leveduras **K99** (*C. neoformans*, com cápsula), **Cap59** (*C. neoformans*, sem cápsula), **R265** (*C. gatii*, com capsula) e **Pb01** (*P. lutzii*). Para os isolados K99 e R265 foi utilizado o anticorpo monoclonal IgG1 18B7 contra o componente GXM da cápsula e para o isolado CAP59 e Pb01 foi utilizado complemento fresco de cobraia. Representação de 3 experimentos independentes feitos em triplicata.

Figura 1.12. Expressão de MHCII de macrófagos J774.16 **(A)** e macrófagos primários **(B)** que fagocitaram as leveduras **K99** (*C. neoformans*, com cápsula), **Cap59** (*C. neoformans*, sem cápsula), **R265** (*C. gatii*, com capsula) e **Pb01** (*P. lutzii*). A fagocitose ocorreu nos tempos de 4 horas e 8 horas à 37 °C em 10% de CO₂. Para os isolados K99 e R265 foi utilizado o anticorpo monoclonal IgG1 18B7 contra o componente GXM da cápsula e para o isolado CAP59 e Pb01 foi utilizado complemento fresco de cobaia. **Letras**, significam diferenças estatísticas significantes, o teste usado foi ANOVA com pós teste de Tukey $p < 0,005$. **, significa diferenças estatísticas significantes, o teste usado foi o teste T, *two tailed*, $p < 0,001$. Representação de 3 experimentos independentes feitos em triplicata.

1.4.4 Ensaio de proliferação de linfócitos

Linfócitos primados foram recolhidos de linfonodos inguinais de camundongos imunizados com leveduras de *Cryptococcus* spp e Pb01. As células foram colocadas na presença de macrófagos ativados e fixados que fagocitaram as leveduras nos tempos de 4 e 8 horas. As **figuras 1.13** mostram a estratégia de seleção positiva dos linfócitos.

A **Figura 1.14** sintetiza os resultados de proliferação dos linfócitos estimulados com peptídeos de *Cryptococcus* spp. e Pb01. Com relação a *Cryptococcus* spp., tanto para macrófagos J774.16 quanto para macrófagos primários houve proliferação em 4 e 8 horas de fagocitose. Entretanto há uma variabilidade entre os dados, de maneira geral todos os isolados foram mais eficientes em proliferar os linfócitos no tempo de 8 horas de fagocitose para ambos macrófagos. Já para Pb01, houve mais proliferação no tempo de 4 horas para macrófagos J774.16. Para macrófagos primários o tempo de 8 horas foi melhor em proliferar os linfócitos.

1.4.5. Purificação e sequenciamento de epítopos de *Cryptococcus* spp. e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01)

Após a realização do ensaio de fagocitose por 8 horas, o equivalente a 10^9 macrófagos primários foram lisados e submetidos a cromatografia de afinidade para purificação do complexo MHCII-peptídeo. Esses complexos foram passados em um filtro com o limite de 30 kDa, para concentração e separação dos peptídeos do MHCII. Os peptídeos foram levados ao espectrômetro de massas onde foram sequenciados, a **tabela 1.2** compila todos os resultados obtidos do sequenciamento. Oitenta e quatro proteínas foram identificadas do isolado K99, uma do isolado Cap59, três do isolado R265 e uma do isolado Pb01. O sequenciamento do imunocomplexo formado com antígenos do isolado Pb01 (*Paracoccidioides lutzii*) revelou um único peptídeo cuja a sequência apresenta 14 resíduos de alaninas. Este peptídeo cobre 7% de uma proteína hipotética de 19 kDa que contém 191 aminoácidos. A **Figura 1.15**, indica a sequência da proteína hipotética e a localização do peptídeo. Através de um alinhamento (BLAST) foi observado que esta proteína está presente em vários fungos como *H. capsulatum*, *B. glischistii*, *C. posadasii* e *P. lutzii*. Entretanto somente *P. lutzii* possui a mesma região onde o peptídeo identificado se localiza. Para corroborar, foi feita uma predição *in silico* da proteína hipotética utilizando o MHC-II *Binding Predictions* disponibilizado pelo *Immune Epitope Database and Analysis Resource*. A análise demonstrou que o

peptídeo de fato e se liga na fenda do MHCII de camundongos da linhagem C57BL/6 (**Figura 1.16 e 1.17**).

Figura 1.13. Estratégia de seleção positivas dos linfócitos primados de camundongos imunizados com leveduras de Pb01 e *Cryptococcus* spp.. **SSC-A** (área de Side scatter), **CD3** (marcador de linfócito), **7AAD** (marcador de viabilidade) e **Cell Trace far Red** (indicador de proliferação).

Figura 1.14. Porcentagens de proliferação de linfócitos em co-cultura com J774.16 **(A)** e macrófagos primários **(B)**. A fagocitose ocorreu nos tempos de 4 horas e 8 horas à 37 °C em 10% de CO₂. Após o tempo de fagocitose as células foram fixadas e linfócitos recuperados de linfonodos de animais imunizados com as respectivas leveduras foram adicionados. Foram utilizadas Leveduras **K99** (*C. neoformans*, com cápsula), **Cap59** (*C. neoformans*, sem cápsula), **R265** (*C. gatii*, com capsula) e **Pb01** (*P. lutzii*). Para os isolados K99 e R265 foi utilizado o anticorpo monoclonal IgG1 18B7 contra o componente GXM da cápsula e para o isolado CAP59 e Pb01 foi utilizado complemento fresco de cobaia. Representação de 3 experimentos independentes feitos em triplicata.

Tabela 1.2. Sequenciamento dos peptídeos purificados de macrófagos primários que fagocitaram **K99** (*C. neoformans*, com cápsula), **Cap59** (*C. neoformans*, sem cápsula), **R265** (*C. gatii*, com capsula) e **Pb01** (*P. lutzii*) após 8 horas de fagocitose.

K99		
Proteína	Número de acesso	Peso molecular
allergen [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012050709.1	26 kDa
elongation factor 1-alpha [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012053151.1	50 kDa
ATP synthase subunit beta, mitochondrial [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012050629.1	59 kDa
enolase [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012048316.1	48 kDa
F-type H -transporting ATPase subunit H, variant [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012049238.1	13 kDa
allergen [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012053212.1	27 kDa
hypothetical protein CNAG_00626 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012046847.1	24 kDa
malate dehydrogenase, NAD-dependent [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012050895.1	35 kDa
F-type H -transporting ATPase subunit B [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012052621.1	26 kDa
transaldolase [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012052888.1	35 kDa
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012050787.1	36 kDa
hsp71-like protein [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012052712.1	70 kDa
hypothetical protein CNBD5360 [Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A]	XP_775807.1	74 kDa
hypothetical protein CNAG_03058 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012048308.1	12 kDa
phosphoglycerate kinase [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	XP_571947.1	49 kDa
hypothetical protein CNAG_02843 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012048172.1	30 kDa
ATP synthase F1, delta subunit [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012049390.1	22 kDa
hypothetical protein CNAG_06578 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012050710.1	20 kDa
cytochrome c oxidase subunit 5a [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012047506.1	16 kDa
cytochrome c oxidase subunit 5a [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012047506.1	16 kDa
hypothetical protein CNBI2830 [Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A]	XP_773342.1	29 kDa
cytochrome c oxidase polypeptide iv, mitochondrial precursor [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003193458.1	17 kDa
nascent polypeptide-associated complex subunit beta [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012053770.1	19 kDa
hypothetical protein, variant [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012048265.1	70 kDa
aspartate aminotransferase mitochondrial precursor [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	XP_568414.1	50 kDa
hypothetical protein CNAG_02118 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012049957.1	41 kDa
alcohol dehydrogenase (NADP) [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012052832.1	37 kDa
hypothetical protein CNAG_00091 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012046521.1	53 kDa
ADP/ATP carrier protein [Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A]	XP_772174.1	34 kDa
alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012050177.1	38 kDa
glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	XP_572533.1	65 kDa
elongation factor 3 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012049054.1	116 kDa
chaperonin GroES [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012047532.1	11 kDa
hypothetical protein CGB_D1510C [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003193367.1	8 kDa
conserved hypothetical protein [Paracoccidioides sp. 'lutzii' Pb01]	XP_002792300.1	39 kDa
actin [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012046325.1	42 kDa
cytoplasmic protein, variant [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012048239.1	61 kDa
hypothetical protein CNBF1800 [Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A]	XP_775017.1	13 kDa
F-type H -transporting ATPase subunit D [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012047759.1	19 kDa
hypothetical protein, variant 1 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012047001.1	103 kDa
cytoplasmic protein [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012048339.1	31 kDa
hypothetical protein, variant [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012047516.1	20 kDa
hypothetical protein CNAG_00894 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012049179.1	8 kDa
mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM8 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012050391.1	10 kDa
thioredoxin reductase [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012050575.1	40 kDa
cytoplasmic protein [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012049371.1	38 kDa
hypothetical protein PADG_11062 [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	XP_010756665.1	19 kDa
rho small monomeric GTPase [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003195571.1	21 kDa
proline-tRNA ligase [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012047323.1	83 kDa
hypothetical protein CNBD4080 [Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A]	XP_775679.1	33 kDa
chaperone DnaK [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012048779.1	72 kDa
mitochondrial processing peptidase beta subunit, mitochondrial precursor (beta-mpp) [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003195399.1	52 kDa

hypothetical protein CNAG_01031 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012049269.1	41 kDa
heat shock protein [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003191259.1	61 kDa
RAN protein binding protein [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012047193.1	57 kDa
UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012048102.1	56 kDa
hypothetical protein CNBI0500 [Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A]	XP_773436.1	80 kDa
cyclophilin [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003195409.1	24 kDa
F-type H -transporting ATPase subunit delta [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012047112.1	18 kDa
RNA binding protein [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012047623.1	39 kDa
cytochrome c oxidase subunit 6a [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012048235.1	13 kDa
F-type H -transporting ATPase subunit J [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012048247.1	7 kDa
protein transporter [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	XP_570193.1	11 kDa
nucleoside-diphosphate kinase [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003193965.1	24 kDa
serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit A1 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012052213.1	72 kDa
heat shock protein [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003192750.1	69 kDa
elongation factor 1-beta (ef-1-beta) [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003192853.1	24 kDa
aldehyde dehydrogenase [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003194658.1	55 kDa
cytochrome c oxidase subunit V [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003196574.1	18 kDa
hypothetical protein CNAG_01052 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012049081.1	39 kDa
glutathione-disulfide reductase [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012050124.1	52 kDa
mannose-6-phosphate isomerase, class I [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012052178.1	50 kDa
hypothetical protein [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	XP_567638.1	51 kDa
ribosomal protein L4 [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	XP_572378.1	29 kDa
catalase [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012048638.1	80 kDa
nitric oxide dioxygenase [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012052541.1	56 kDa
hypothetical protein CNAG_01743 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012052728.1	9 kDa
hypothetical protein CGB_D5090W [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003193625.1	79 kDa
fructose-bisphosphate aldolase 1 [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012047721.1	39 kDa
fatty-acid synthase complex protein [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003194424.1	276 kDa
histone H2A, variant [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012047708.1	14 kDa
histone H2A, variant [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012047708.1	14 kDa
hypothetical protein PADG_07331 [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	XP_010762815.1	50 kDa
Cap59		
Proteína	Número de acesso	Peso molecular
hypothetical protein CNA05900 [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	XP_566943.1	62 kDa
R265		
Proteína	Número de acesso	Peso molecular
actin [Cryptococcus neoformans var. grubii H99]	XP_012046325.1	42 kDa
rho small monomeric GTPase [Cryptococcus gattii WM276]	XP_003195571.1	21 kDa
hypothetical protein CNBI0220 [Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A]	XP_773656.1	21 kDa
Pb01		
Proteína	Número de acesso	Peso molecular
hypothetical protein PADG_11062 [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	XP_010756665.1	19 kDa

XP_010756665.1 (95%), 19,051.3 Da
 hypothetical protein PADG_11062 [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]
 1 exclusive unique peptides, 1 exclusive unique spectra, 1 total spectra, 14/191 amino acids (7% coverage)

```

MVFLSVRDYE  LLVENYKAIO  AENYOLREYI  ISLOSRLIDS  ONEVPELPGN
IDLSOPRNDP  PAPVVPGAAS  SAAAAA      AAAAAA      TGAAPTGIPT
ATPADOPEOV  NALNRIAVAG  LGMRKHOHDE  AAFLSAGNAA  AGAGAAAGNG
SVGVAMGVGV  TGAELPSKR   IRFEGLSDA  EQGKVGDI  PA  S

```

Figura 1.15. Sequência da proteína hipotética de Pb18 (*P. brasiliensis*) e a localização do peptídeo sequenciado na amostra de fagocitose de 8 horas de macrófagos primários com Pb01.

NetMHCII 2.2 Server - prediction results

Technical University of Denmark

Input is in FSA format

Peptide length 15

NetMHCII version 2.2.

Strong binder threshold 50.00. Weak binder threshold 500.00.

Allele	pos	peptide	core	1-log50k(aff)	affinity(nM)	%Rank	Identity	Bind Level
H-2-IAb	1	SAAAAAAAAAAAAA	AAAAAAAAA	0.7005	25.5	0.15	XP_0107566	SB
H-2-IAb	2	ASSAAAAAAAAAAAA	AAAAAAAAA	0.6996	25.8	0.15	XP_0107566	SB
H-2-IAb	3	SSAAAAAAAAAAAAA	AAAAAAAAA	0.6995	25.8	0.15	XP_0107566	SB
H-2-IAb	4	AASSAAAAAAAAAAAA	AAAAAAAAA	0.6897	28.7	0.20	XP_0107566	SB
H-2-IAb	5	AAAAAAAAAAAAAAAA	AAAAAAAAA	0.6862	29.8	0.20	XP_0107566	SB
H-2-IAb	6	AAAAAAAAAAAAAAAA	AAAAAAAAA	0.6862	29.8	0.20	XP_0107566	SB
H-2-IAb	7	AAAAAAAAAAAAAAAA	AAAAAAAAA	0.6862	29.8	0.20	XP_0107566	SB
H-2-IAb	8	AAAAAAAAAAAAAAAA	AAAAAAAAA	0.6862	29.8	0.20	XP_0107566	SB
H-2-IAb	9	AAAAAAAAAAAAAAAA	AAAAAAAAA	0.6862	29.8	0.20	XP_0107566	SB
H-2-IAb	10	AAAAAAAAAAAAAAT	AAAAAAAAA	0.6838	30.6	0.20	XP_0107566	SB
H-2-IAb	11	AAAAAAAAAAAAAATG	AAAAAAAAA	0.6770	32.9	0.20	XP_0107566	SB
H-2-IAb	12	AAAAAAAAAAAAATGA	AAAAAAAAA	0.6756	33.5	0.30	XP_0107566	SB
H-2-IAb	13	GAASSAAAAAAAAAA	AAAAAAAAA	0.6750	33.7	0.30	XP_0107566	SB

Figura 1.16. Mapeamento *in silico* de epitopos a partir da sequência da proteína hipotética de Pb18. A análise foi realizada no NetMHCII 2.2 Server, onde estão representados peptídeos com capacidade de ligação ao MHC de classe II, classificados com ligantes fortes (SB).

MHC-II Binding Prediction Results

Input Sequences

#	Name	Sequence
1	XP_010756665.1 hypothetical protein PADG_11062 [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	MVFLSVRDYELLVENYKAIQAENYQLREYIIISLQSRLLDSQNEVPELPGN IDLSQPRNDPPAPVVPGAASSAAAAAAAAAAAAAAAAAATGAAPTGIPT ATPADQPEQVNALNRIAVAGLGMKQHQHDEAAFLSAGNAAAGAGAAGNNG SVGVAMGVGVTGGAEPLSKRIRFEGLSDAAEQKVGDIPAS

Prediction method: IEDB recommended | Low percentile_rank = good binders

[Download result](#)

Citations

Check to expanded the result: ☒

Allele	#	Start	End	Peptide	Method used	Percentile rank	SMM align core	SMM align IC50(nM)	SMM align rank	NN align core	NN align IC50(nM)	NN align rank
H2-IAb	1	61	75	PAPVVPGAASSAAAA	Consensus (smm/nn)	1.05	WPGAASSA	148	1.39	VVPGAASSA	53.90	0.70
H2-IAb	1	68	82	AASSAAAAAAAAAAAA	Consensus (smm/nn)	1.05	SAASAAAAA	181	1.75	AAAAASAAA	35.50	0.35
H2-IAb	1	67	81	GAASSAAAAAAAAAAAA	Consensus (smm/nn)	1.05	SAASAAAAA	179	1.73	SSASAAAAA	36.70	0.38
H2-IAb	1	69	83	ASSAAAAAAAAAAAAA	Consensus (smm/nn)	1.10	SAASAAAAA	189	1.84	AAAAASAAA	36.40	0.37
H2-IAb	1	62	76	APVVPGAASSAAAAA	Consensus (smm/nn)	1.12	WPGAASSA	149	1.40	VVPGAASSA	61.70	0.85
H2-IAb	1	66	80	PGAASSAAAAAAAAAAAA	Consensus (smm/nn)	1.15	SAASAAAAA	181	1.75	SSASAAAAA	45	0.54
H2-IAb	1	65	79	VPGAASSAAAAAAAAAAAA	Consensus (smm/nn)	1.19	GAASSAAAA	175	1.68	SAASAAAAA	53.20	0.69
H2-IAb	1	64	78	VVPGAASSAAAAAAAAAAAA	Consensus (smm/nn)	1.30	GAASSAAAA	182	1.77	GAASSAAAA	60.50	0.83
H2-IAb	1	63	77	PVVPGAASSAAAAAAAAAAAA	Consensus (smm/nn)	1.36	GAASSAAAA	189	1.84	VVPGAASSA	63.10	0.88
H2-IAb	1	70	84	SSAAAAAAAAAAAAAA	Consensus (smm/nn)	1.41	AAAAASAAA	237	2.39	AAAAASAAA	39	0.42
H2-IAb	1	77	91	AAAAAAAAAAAAAAT	Consensus (smm/nn)	1.42	AAAAASAAA	225	2.26	AAAAASAAA	47.30	0.58
H2-IAb	1	60	74	PPAPVVPGAASSAAA	Consensus (smm/nn)	1.45	WPGAASSA	209	2.08	VVPGAASSA	59.80	0.81
H2-IAb	1	71	85	SAASAAAAAAAAAAAA	Consensus (smm/nn)	1.45	AAAAASAAA	237	2.39	AAAAASAAA	43.10	0.50
H2-IAb	1	59	73	DPPAPVVPGAASSAA	Consensus (smm/nn)	1.46	WPGAASSA	197	1.94	VVPGAASSA	67.40	0.97
H2-IAb	1	78	92	AAAAAAAAAAAAATG	Consensus (smm/nn)	1.47	AAAAASAAA	226	2.27	AAAAASAAA	52.30	0.67
H2-IAb	1	72	86	AAAAAAAAAAAAAA	Consensus (smm/nn)	1.47	AAAAASAAA	237	2.39	AAAAASAAA	45.60	0.55
H2-IAb	1	73	87	AAAAAAAAAAAAAA	Consensus (smm/nn)	1.47	AAAAASAAA	237	2.39	AAAAASAAA	45.60	0.55
H2-IAb	1	74	88	AAAAAAAAAAAAAA	Consensus (smm/nn)	1.47	AAAAASAAA	237	2.39	AAAAASAAA	45.60	0.55
H2-IAb	1	75	89		Consensus	1.47	AAAAASAAA	237	2.39	AAAAASAAA	45.60	0.55

Figura 1.17. Mapeamento *in silico* de epítomos a partir da sequência da proteína hipotética de Pb18. A análise foi realizada no MHC-II Binding Prediction, onde o programa classificou os peptídeos na tabela em ordem decrescente de probabilidade de ligação ao MHC de classe II.

1.5 Discussão

Os isolados Pb01 e Pb18 são de diferentes espécies, portanto abordagens para o desenvolvimento de vacinas baseados somente na gp43 e no seu epitopo imunoprotetor P10, podem não ser efetivas. Além disso, as atuais terapias disponíveis para criptococose permanecem insatisfatórias, uma vez que o tratamento atual requer administração prolongada de antifúngicos, e mesmo com tratamento há uma alta mortalidade e morbidade. Com isso, é importante a pesquisa de novas alternativas para uma vacina contra a PCM e a criptococose.

Na primeira parte deste trabalho, foi proposto o desenvolvimento de um sistema onde há produção e purificação de exoantígenos e antígenos de parede de *Paracoccidioides* spp. Para isto, o cultivo dos isolados de *P. lutzii*: Pb01, 1578 e ED01, assim como do isolado Pb339 de *P. brasiliensis* em dois meios de cultura distintos (MMcM, e Fava Netto) foi feito a fim de comparar o perfil de proteínas produzidas pelos diferentes isolados. Na **figura 1.1**, nota-se que cada isolado de *P. lutzii* exibiu um perfil de expressão de proteínas peculiar. Perfis diferentes demonstram a heterogeneidade, já previamente relatada para expressão de proteínas em isolados de *P. brasiliensis* cultivado em diferentes meios de cultura. Variáveis como o meio de cultivo, o isolado utilizado, o tamanho do inóculo e o tempo de incubação podem interferir na expressão das proteínas assim como na reprodutibilidade dos protocolos (87,111). Apesar da heterogeneidade na expressão de proteínas, todos isolados de *P. lutzii* e o isolado 339 de *P. brasiliensis* exibiram uma banda com aproximadamente 66 kDa em 15 dias de cultivo em meio Fava Netto. A partir desse ponto, analisamos a produção de antígenos de parede e exoantígenos nesta condição de cultivo. A **figura 1.3** mostra os antígenos de parede, e os exoantígenos encontrados nas amostras de sobrenadante de cultura dos isolados de *P. lutzii* e *P. brasiliensis*. Para todas as amostras de antígenos de parede uma banda de 66KDa foi observada. O fato destas bandas serem compartilhadas tanto pelos os isolados de *P. lutzii* quanto o de *P. brasiliensis* mostra um possível candidato vacinal para ambas as espécies. Entretanto, para as amostras de exoantígeno não houve um compartilhamento de bandas, isto talvez possa ser decorrente a uma baixa produção dessa proteína nestas condições. Contudo, proteínas de baixo peso molecular são compartilhadas entre os isolados da espécie *lutzii*.

Então, foi proposto a purificação destes antígenos e exoantígenos a partir de uma cromatografia de gel filtração. A **figura 1.4** mostra os cromatogramas das corridas das amostras tanto de parede quanto de exoantígeno do isolado Pb01. Baseado nos perfis cromatográficos fica bem claro que as amostras de parede estão bem mais purificadas que a amostra de exoantígeno, isso devido as definições dos picos. Entretanto, todas as frações das três corridas foram submetidas a dot blot. O objetivo foi localizar em quais frações as proteínas imunogênicas de parede e os exoantígenos estavam localizados (**Figura 1.5**). O resultado do dot blot indica que as proteínas imunogênicas das amostras se encontram na faixa de 66 kDa, isso porque uma corrida realizada com albumina (66 KDa) foi feita e as frações de albumina foram aluídas nas mesmas frações que o dot blot foi positivo para proteínas imunogênicas. Entretanto, a quantidade de material purificado foi baixíssimo, mas mesmo assim foi submetido gel de SDS-Page e com muita dificuldade foi verificado 2 bandas na região de 66kDa (**Figura 1.6**). Isso indica que a purificação com a coluna de gel filtração não foi boa suficientemente para individualizar as proteínas. Apesar disso, as amostras foram preparadas e levadas para o espectrômetro de massa para identificação. Para isto, as sequências foram confrontadas com o banco de dados do genoma de *Paracoccidioides*, através do programa Mascot. Os resultados estão resumidos na **tabela 1.1**. Para as análises do exoantígeno, foram identificadas duas proteínas somente na fração 7 e nenhuma foi identificada na fração 8. As proteínas encontradas foram Selenocisteína liase, que está envolvida no metabolismo do selênio e exibe a massa de 53 kDa (112) e uma beta quimaerina, que possui várias funções como transporte intracelular e atividade GTPase(113). Nas amostras de parede, foram encontradas duas proteínas. A proteína SEY 1 ligadora de GTP, que está presente nos tempos de 7 e 15 dias e uma proteína não caracterizada que está presente somente no tempo de 7 dias. Era de se esperar encontrar a mesma proteína para todas as purificações, contudo não foi isso que aconteceu. Acreditamos que a coluna de gel filtração não foi a ideal opção em purificar os antígenos e exoantígenos, pois houve uma grande perda de proteínas na purificação, afetando as análises feitas pelo espectrômetro de massas. Contudo, a proteína SEY 1 e a beta quimaerina possuem atividades relacionadas com GTP, mostrando que estas proteínas apesar de serem diferentes apresentam atividades

similares. Quando analisamos a massa molecular destes antígenos, notamos ser diferentes das frações observadas nos géis de SDS-PAGE. Esta diferença ocorre devido as condições desnaturantes que as frações são submetidas durante a corrida eletroforética.

Todavia, a utilização de meios complexos como Fava Netto onde há muitas proteínas provenientes de extrato de carne, de levedura e da peptona, mesmo tomando os devidos cuidados, uma possível contaminação das proteínas do meio pode ocorrer nas proteínas extraídas da parede e do sobrenadante. Além disso, o meio Fava Netto possui uma grande quantidade de glicose e de outros componentes que dificultam bastante o manuseio. Com o objetivo de aperfeiçoar todo o processo de extração proteica tanto da parede quanto do meio de cultura, resolveu-se substituir o meio Fava Netto pelo Meio Dulbecco MEM / Nutriente HAM F-12 acrescido com 1,5% de glicose. O meio F12 foi utilizado para realização do proteoma de extratos proteicos de parede de *Paracoccidioides brasiliensis* na qual se mostrou extremamente eficiente e fácil (110).

A **Figura1.7** mostra o perfil de proteínas da extração de parede e do concentrado de meio de cultura, utilizou-se o meio F-12 para o cultivo de Pb01 no tempo de 7 dias à 37 °C. Pode-se observar que tanto na extração de parede quanto no concentrado de meio de cultura há perfis de proteínas distintos. A extração de parede apresenta proteínas que varia entre 97 kDa a 31 kDa, sendo que a maioria das proteínas possuem a mesma quantidade. Entretanto, o concentrado de meio de cultura apresenta poucas proteínas em relação a extração de parede, contudo, pode-se observar que há proteína majoritárias na região entre 97 kDa e 45 kDa. Apesar disso, em um SDS-PAGE de 15%, feito para observar proteínas de baixo peso molecular, foi visto que a amostra do concentrado de cultura apresenta proteínas de baixo peso em altas quantidades. Isso não aconteceu com a amostra de extração de parede (**Figura1 8**).

Por conseguinte, foi feita a prospecção de antígenos nas duas amostras. A **figura 1.9** mostra o western blot realizado com as amostras de extração de parede e do concentrado de meio de cultura. Foi observado que na amostra de extração de parede há pelo menos 8 proteínas reativas ao soro de camundongos infectados com Pb01. Os tamanhos destes antígenos variam em torno de 110 a 41 kDa. Por outro lado, a

amostra de concentrado de cultura revelou apenas duas bandas muito fracas relativas a dois antígenos de aproximadamente 80 kDa e 50 kDa.

A segunda parte deste trabalho, tem como objetivo elaborar um sistema onde é possível purificar epitopos, que são apresentados naturalmente por macrófagos via MHC de classe dois (MHCII). Foram utilizadas leveduras de *Paracoccidioides lutzii* (Pb01), *Cryptococcus neoformans* (K99 e o mutante Cap59, sem cápsula) e *Cryptococcus gatii* (R265). A capsula do *Cryptococcus* além de ser um dos principais fatores de virulência, não é imunogênica (114,115). Foi visto que polissacarídeos provenientes da cápsula reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e provocam a produção de outras citocinas que estão associadas com efeitos inibitórios na resposta imune contra *Cryptococcus*. Estes polissacarídeos, inibem a secreção de TNF dos monócitos humanos estimulados com LPS (115) enquanto induzem a produção de IL-10 *in vitro*, assim inibindo a proliferação de linfócitos T. (115,116). Portanto, fui incluído o mutante Cap59 para observar a influencia da cápsula na identificação dos epitopos. Também, duas linhagens distintas de macrófagos foram usadas, J774.16, derivada de um sarcoma de células reticulares (117) e macrófagos primários. Muitos trabalhos que visam purificar peptídeos apresentados por MHCII utilizam células dendríticas (108,109,118). As células dendríticas, entre as células apresentadoras de antígenos, é a mais eficiente em apresentar antígenos, além de possuir mais moléculas de MHCII. (119). De acordo com a literatura, são necessários no mínimo 10^9 células para que haja uma quantidade suficiente de peptídeos para detecção do espectrômetro de massas. Embora as células dendríticas são mais eficientes que os macrófagos, o custo de produção é muito elevado levando em consideração que rendimento é muito baixo. Macrófagos, por sua vez possuem um rendimento muito melhor.

Embora, já foi demonstrado que após 4 horas de fagocitose já é possível purificar peptídeos das moléculas de MHCII (118), no presente estudo foi incluído o tempo de 8 horas de fagocitose. Nos tempos de 4 e 8 horas, com exceção de Cap59 houve uma fagocitose de mais de 50% para os macrófagos J774.16. Diferentemente, macrófagos primários apresentaram uma fagocitose maior que 50% para todas as leveduras. Em relação a expressão de MHCII na superfície dos macrófagos, foi visto que não houve

diferença na expressão de MHCII entre os dois tempos. Mas, houve uma variação entre as linhagens de macrófagos. A linhagem J774.16, tanto para 4 ou 8 horas, a expressão de MHCII de todos os grupos foram diferentes do controle. Entretanto o isolado Cap59 provocou a expressão de maior quantidade de moléculas de MHCII na superfície celular. Isto já era esperado uma vez que o isolado Cap59 não possui cápsula. Os isolados K99 e R265 apresentaram a mesma quantidade de expressão de MHCII. Macrófagos J774.16 que fagocitaram leveduras de Pb01 também expressaram mais moléculas de MHCII comparado com controle, aproximadamente duas vezes mais. Interessantemente, macrófagos primários que fagocitaram Cap59 apresentaram uma expressão de MHCII menor que o controle. Isso pode ser explicado pelo fato que macrófagos distintos podem apresentar um perfil de expressão de molécula diferentes.(120).Contudo, macrófagos primários apresentam um numero muito maior de MHCII que J774.16. A subcultura de linhagens celulares pode causar perda de genes e prejudicar as funções imunológicas dos macrófagos (121).

A apresentação de antígenos por células apresentadoras de antígenos é muito dinâmica, as moléculas de MHCII que estão carregadas com o peptídeo imunogênico não permanece por muito tempo na superfície celular. Além disso as células estão constantemente apresentando peptídeos do meio extracelular ou da própria célula (122). Logo, para confirmar se os tempos de 4 e 8 horas apresentam MHCII na superfície celular e se os peptídeos apresentados por essas moléculas são funcionais foi feito um ensaio de proliferação de linfócitos. Houve proliferação para ambas as células para todos os grupos e nos dois tempos analisados. Todavia, o tempo de 8 horas se mostrol o ideal, pois exibiu maior proliferação. Desse modo, para o presente trabalho foi escolhido macrófagos primários e o tempo de fagocitose de 8 horas para a coleta e purificação dos epitopos.

A concentração de 10^9 macrófagos primários foi infectados com K99 (*C. neoformans*, com cápsula), Cap59 (*C. neoformans*, sem cápsula), R265 (*C. gatii*, com capsula) e Pb01 (*P. lutzii*) e após 8 horas de fagocitose, as células foram lisadas e submetidas a uma cromatografia de afinidade para subsequente purificação e sequenciamento dos epitopos. Foram 84 proteínas identificadas da amostra de K99, 1 para Cap59, 3 para R265 e 1 para Pb01.

Na amostra de Pb01 foi identificado um único peptídeo de 14 resíduos de alaninas, esse peptídeo se encontra entre o aminoácido 72 e 85 de uma proteína

hipotética de Pb18, cobrindo 7% da sequência. Esta proteína não possui função até o momento, entretanto foi feito um alinhamento na busca de encontrar essa proteína em outros fungos. Esta proteína apresenta-se em outros fungos como *H. capsulatum*, *B. glabrata*, *C. posadasii* e *P. lutzii*. Entretanto, somente a proteína de *P. lutzii* apresenta região onde o peptídeo identificado se encontra. Portanto para uma futura vacina peptídica, este peptídeo poderia ser utilizado para ambas as espécies de *Paracoccidioides*. Contudo, para corroborar, foi feita uma análise *in silico* para observar o potencial de ligação do peptídeo no MHCII. Para o alelo H2-IAb (C57BL/6) o peptídeo apresentou uma alta ligação.

1.6 Conclusão

- Foi estabelecido um sistema de produção de antígenos tanto de parede quanto do concentrado de cultura para leveduras de *Paracoccidioides lutzii* utilizando os meios Fava Netto, e F-12. Onde, foram sequenciados e identificados antígenos de parede e exoantígenos oriundos do meio Fava Netto. Entretanto, o meio F-12 se mostra mais fácil e de melhor manuseio pelas características simples e de menos glicose do meio. Contudo, a coluna de gel filtração não se mostrou adequada para a purificação de antígenos de parede e de exoantígenos, pois houve uma grande perda de proteínas ao longo da purificação.
- Foi estabelecido um sistema onde há purificação e sequenciamento de epitopos naturalmente apresentados por macrófagos. Onde, macrófagos primários é a melhor opção para ser utilizado como célula apresentadora de antígeno e O tempo de 8 horas de fagocitose se mostrou ideal para recuperação de epitopos funcionais.
- Os peptídeos purificados são funcionais pois induziram a proliferação de linfócitos T

CAPÍTULO 2 - MILTEFOSINA, UM POTENCIAL ANTIFUNGICO PARA *PARACOCIDIODES* SPP. QUE EM CONCENTRAÇÕES SUB INIBITÓRIAS INDUZ MELANIZAÇÃO

Nesse capítulo serão apresentados os resultados do estudo desenvolvido em colaboração com a Profa. Dra. Kelly Ishida, professora doutora do departamento de Microbiologia do ICB-USP, e sua equipe.

O projeto consistiu em analisar a atividade antifúngica da miltefosina em isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* *in vitro*. Observamos que na concentração sub-inibitória a miltefosina foi capaz de induzir melanogênese nas leveduras.

Artigo aceito para publicação

Jornal: International Journal of Antimicrobial Agents.

Título do artigo: Miltefosine is Fungicidal to *Paracoccidioides* spp. yeasts cells but sub-sub-inhibitory concentrations induce melanization.

Autores: Diego Conrado Pereira Rossi ^{a,†}, Cristina de Castro Spadari ^{b,†,*}, Joshua Daniel Nosanchuk ^c, Carlos Pelleschi Taborda ^a, Kelly Ishida ^{b,*}

[†]Ambos autores contribuíram igualmente

^aLaboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil,

^bLaboratório de Quimioterapia Antifúngica, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil,

^cDepartments of medicine and Microbiology/Immunology, Albert Einstein College of Medicine, New York, United States

2.1 Introdução

A miltefosina (MLT) pertence à classe das alquilfosfocolinas, as quais são ésteres de fosfocolina de alcoóis alifáticos de cadeia longa. As alquilfosfocolinas estão estruturalmente relacionadas ao grupo dos alquil-lisofosfolipídeos, análogos sintéticos de lisofosfatidilcolina ou lisolecitina sem o esqueleto de glicerol(123–125). Sua fórmula empírica é $C_{21}H_{46}NO_4P$ e a massa molecular igual a 407,57 g/mol. É um composto anfifílico devido ao grupo amino quaternário carregado positivamente (carregado permanentemente) e ao grupo fosforil carregado negativamente. O composto cristalino é um pó higroscópico e se dissolve facilmente em solventes aquosos e orgânicos (126)

O composto foi desenvolvido originalmente como um fármaco antitumoral. Entretanto, a MLT exibe um amplo espectro de atividade no controle de parasitas e fungos (123–125). Em muitos países da América Latina, na Índia, na Alemanha, etc a MLT é usada no tratamento da leishmaniose. Atualmente, a MLT é aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos para o tratamento da leishmaniose visceral (127).

A atividade antifúngica da MLT foi exibida contra fungos dimórficos como *Coccidioides posadasii* (128), *Histoplasma capsulatum*, e *Sporothrix* spp.(128–130), fungos filamentosos de relevância clínica como *Aspergillus* spp., *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e cepas resistentes a antifúngicos azólicos (131,132), dermatófitos (133), *Scedosporium* spp. (134), e leveduras incluindo *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, e *Cryptococcus gattii*, (135). Além disso, a MLT apresentou atividade contra biofilmes de *C. albicans* (136,137) e *F. oxysporum* (131). Estudos *in vivo* também mostraram a eficiência da MLT em modelos murinos de criptococose (135) e candidíase oral (136).

Contudo, há algumas preocupações para o uso disseminado da MLT, uma delas é o potencial teratogênico (138) e sua elevada meia vida (150-200 h), a qual pode facilitar a origem de mecanismos de evasão, devido à permanência de níveis sub-terapêuticos da droga na corrente sanguínea por algumas semanas após o tratamento (139). Todavia, os eventos adversos observados nos estudos clínicos da MLT em geral são brandos e toleráveis, sendo representados principalmente por desconforto

gastrointestinal transitório como vômito e diarreia, e aumento dos níveis das transaminases hepáticas e da creatinina (127,140).

2.2 Objetivos

2.2.1 Gerais

Embora a atividade antifúngica da MLT tenha sido relatada para muitos fungos, não há estudo que demonstra os efeitos da MLT contra *Paracoccidioides* spp. Assim, nosso objetivo geral foi avaliar os efeitos antifúngicos *in vitro* de MLT em leveduras de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.

2.2.2 Específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima da MLT associada ou não a outras drogas antifúngicas para diferentes isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.
- Avaliar a interação sinérgica entre a MLT e outras drogas antifúngicas contra leveduras de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.
- Analisar morfologicamente os efeitos da MLT nos isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Fungos

Foram utilizados os isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18, Pb339, Pb113 Pbcão) e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01, Ed01 Pb1578, Pb8334, Pb66), obtidos no Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os isolados foram mantidos semanalmente através de repiques em meio Fava Netto à temperatura de 37 °C.

2.3.2 Drogas antifúngicas

Miltefosina (MLT, Cayman Chemical Company, MI, EUA) foi diluída em água destilada estéril. Anfotericina B (AMB), itraconazol (ITZ), sulfametoxazol (SMX), trimetoprima (TMP) (todos obtidos da Sigma Aldrich Co., MO, EUA) e triciclazol (TCZ, Dow Agrosciences, IN, EUA) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich Co., MO, EUA). A combinação entre sulfametoxazol e trimetoprima (SMX/TMP) (Roche, SP, Brasil) foi diluída em água destilada estéril para obter a concentração de 80 mg/mL de SMX e 16 mg/mL de TMP. A concentração das soluções estoque de MLT e AMB foi de 1600 µg/mL e de ITZ, SMX, TMP e TCZ foi de 3200 µg/mL, as soluções foram armazenadas à -20 °C.

2.3.3 Avaliação da atividade antifúngica da MLT *in vitro*

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição (141). As leveduras de *Paracoccidioides* spp. foram cultivadas em meio McVeigh e Morton (MVM) à 37 °C com agitação orbital de 150 RPM no período de 7 a 10 dias. Após a incubação, foi realizada uma decantação por gravidade durante 5 minutos para que agregados celulares fossem separados das leveduras. Subsequentemente, as leveduras foram coletadas e quantificadas em câmara de Neubauer. Através de microscopia ótica foi confirmado a remoção dos agregados

celulares. A viabilidade celular foi avaliada utilizando azul de Trypan, na qual foi exibido uma viabilidade maior que 90%.

As drogas antifúngicas foram diluídas de forma seriada do estoque (1:2) em meio MVM em placa de 96 poços em um volume final de 100 μ L, seguido pela adição de 100 μ L de suspensão fúngica obtendo uma concentração final entre $0,5 - 2,5 \times 10^5$ leveduras/mL. As concentrações das drogas antifúngicas utilizadas foram: 0,03 - 16 μ g/mL para MLT, AMB e ITZ, 0,25 - 128 μ g/mL para SMX, TMP e TCZ e 0,03/0,005 - 16/2,56 para SMX/TMP. As placas foram incubadas à 37 °C por 14 dias em câmara úmida. A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu 80-100% do crescimento fúngico comparado com o controle

2.2.4 Sinergismo antifúngico *in vitro*

As combinações de MLT com ITZ, SMX/TMP e TCZ foram feitas utilizando ensaio de microdiluição *in vitro* (142). Os inóculos fúngicos foram preparados de acordo com o item 2.2.3. Após 14 dias de incubação à 37 °C, CIM foi determinada das drogas sem estar associadas, e para as combinações foi feito o cálculo do índice de fração inibitória (IFI). O cálculo consiste em: $IFI = (CIM \text{ da droga A em combinação} / CIM \text{ da droga A sem estar em combinação}) + (CIM \text{ da droga B em combinação} / CIM \text{ da droga B sem estar em combinação})$; onde a MLT corresponde a droga A e ITZ, SMX/TMP e TCZ correspondem a droga B. O resultado foi interpretado da seguinte maneira: sinérgico quando o $IFI \leq 0,5$, indiferente quando o $IFI > 0,5$ e ≤ 4 e antagonista quando $IFI > 4$. (142).

2.2.5 Curva de morte

Leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) ou *P. lutzii* (Pb01) (1×10^5 mL) foram tratadas com diferentes concentrações de MLT (0, 0,5 x CIM, 1 X CIM, 2 x CIM, 4 x CIM e 8 x CIM) em meio MVM por 1, 3, 5, 7 e 14 dias à 37 °C. No tempo de incubação de 7 dias as leveduras também foram tratadas com a combinação de MLT (0,25 x MCI, 0,5 x MIC, e 1 x MCI) com TCZ (32 μ g/ml). Em cada tempo, as leveduras tratadas e não tratadas foram diluídas em 100 μ L de PBS e foram cultivadas em meio sólido de infusão de cérebro e coração suplementado com 4% de soro fetal bovino e 5% de

sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* (cepa 192) (143) à 37 °C por 14 dias para subsequente contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). A atividade fungicida foi determinada pela redução de mais de 99,9% das UFC caso contrário foi considerado um efeito fungistático (144).

2.2.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) ou *P. lutzii* (Pb01) (1×10^5 /mL) foram tratadas com a concentração subinibitória de MLT (0.5 µg/mL) e foram incubadas por 14 dias à 37 °C sob agitação orbital (150 RPM). Após a incubação, as leveduras foram coletadas por centrifugação e foram lavadas três vezes com PBS. As leveduras foram fixadas por 2 horas em temperatura ambiente com 2,5% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão cacodilato pH 7,2. A pós fixação foi feita em 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato contendo 1,25% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de CaCl₂ por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as leveduras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, depois colocada em óxido de propileno a 100% e incorporada na resina de spurr. As secções ultrafinas foram coradas com 0,5% de acetato de uranila e 0,5% de citrato de chumbo, e observadas num microscópio eletrônico de transmissão (modelo Jeol 100CX, JEOL, Japão).

2.2.7 Citometria de fluxo

Leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) ou *P. lutzii* (Pb01) (1×10^5 /mL) foram tratadas com a concentração subinibitória de MLT (0.5 µg/mL) e foram incubadas por 14 dias à 37 °C sob agitação orbital (150 RPM). Após a incubação, as leveduras foram coletadas por centrifugação e foram lavadas três vezes com PBS. As leveduras foram fixadas com 4% de glutaraldeído em PBS por 1 hora a temperatura ambiente. A marcação com o anticorpo monoclonal (Isotipo IgM) contra melanina (6D2 – Gentilmente cedido pelo Dr. Joshua Nosanchuk – Albert Einstein College of Medicine – New York/EUA) foi feita em PBS acrescido com 1% de soro fetal bovino por 30 minutos a 4 °C. (145). Posteriormente, as células foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo contra IgM de camundongo conjugado com FITC (Molecular

Probes). Após lavagem, as células foram submetidas ao citometro de fluxo, BD LSR Fortessa flow cytometer (BD, San Jose, USA). Foram adquiridos 30000 eventos e os dados foram analisados no software FlowJo 7.2.4 (TreeStar, Ashland, USA).

2.2.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6.0, as diferenças estatísticas houveram quando o valor de p foi menor que 0,05.

2.4 Resultados

2.4.1 Miltefosina exibe atividade fungicida em leveduras de *Paracoccidioides* spp.

Todos os resultados de inibição de crescimento dos isolados de *Paracoccidioides* spp. se encontram compilados na **Tabela 2.1**.

A MLT foi eficaz em inibir o crescimento fúngico, exibindo a mesma CIM dos antifúngicos AMB e SMX/TMP (0,12 a 1 µg/mL). Entretanto, o ITZ se mostrou mais eficaz apresentando a menor CIM (CIM menor ou igual a 0,12 µg/mL), enquanto o TCZ falhou em inibir o crescimento (CIM maior que 128 µg/mL). Contudo, SMX e TMP, sem estar associados entre si, exibiram uma alta faixa de concentração para inibir o crescimento dos isolados de *Paracoccidioides* spp (SMX, 0,25 a 16 µg/mL e TMP, 1 a CIM maior que 64 µg/mL). A avaliação fungicida da MLT foi realizada a partir do ensaio de morte, e o resultados estão agrupados na **Figura 2.1**.

Para ambas as espécies, concentrações acima do valor de CIM (>1 µg/mL) produziram um efeito fungicida logo no primeiro dia de exposição à MLT. O tratamento com a concentração de 1 µg/mL foi capaz de erradicar a cultura de Pb18 no quinto dia de exposição, já para a cultura de Pb01 foram necessários 7 dias de exposição.

A concentração sub inibitória 0,5 µg/mL exibiu uma atividade fungicida similar a concentração de 1 µg/mL no primeiro dia de exposição µg/mL. Todavia, houve uma recuperação das leveduras nos dias seguintes. Já, a cultura de Pb18, apesar de ser tratada com 0,5 µg/mL, permaneceu-se íntegra (**Figura 2.1 A e B**).

As combinações entre a MLT, ITZ, SMX/TMP ou TCZ foram indiferentes contra *Paracoccidioides* spp., exibindo IFI maiores que 0,5 e menores ou iguais a 4.

Tabela 2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) da MLT e de drogas antifúngicas frente a isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*.

Isolados	CIM (µg/ml)					
	MLT	AMB	ITZ	SMX	TMP	SMX/TMP
<i>P. brasiliensis</i>						
Pb 339	0,5	0,25	≤0,03	4	>64	2/0,4
Pb 18	1	0,25	0,06	16	>64	8/1,6
Pb 8334	1	0,5	≤ 0,03	0,5	32	0,25/0,05
Pb 113	0,12	0,25	≤ 0,03	2	1	1/0,2
Pb cão	0,25	1	0,12	1	64	1/0,2
<i>P. lutzii</i>						
Pb 01	1	0,5	≤0,03	4	>64	0,25/0,05
ED 01	0,5	0,5	0,06	1	>64	0,5/0,1
Pb 1578	0,5	0,5	≤0,03	0,25	>64	0,12/0,02
Pb 66	1	1	≤0,03	8	>64	0,12/0,02

MLT: miltefosina; AMB: anfotericina B; ITZ: itraconazol; SMX: sulfametoxazol; TMP: trimetoprima

Figura 2.1. Curvas de morte de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) **(A)** e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) **(B)**. Tratadas com diferentes concentrações de MLT (0,5, 1, 2, 4, and 8 µg/mL) à 37 °C por 14 dias. Concentrações iguais ou acima da CIM (≥ 1 µg/mL) foram fungicidas, se mantendo no limite inferior de detecção.

2.4.2 MLT combinada com TCZ reduz a viabilidade de leveduras de *Paracoccidioides* spp.

Embora a combinação de MLT com TCZ tenha sido indiferente, a combinação de concentrações subinibitórias de MLT e TCZ afetou a viabilidade dos fungos, especialmente para Pb01 (**Tabela 2.2**).

As leveduras de *P. lutzii* apresentaram uma redução de 100% após tratamento com a combinação de MLT 0,5 µg/mL com TCZ 32 µg/mL ($p < 0,01$) em comparação com o tratamento da MLT sem estar associada ao TCZ. Além disso, houve também uma redução de 30% após exposição a 0,25 µg/mL de MLT com 32 µg/mL de TCZ ($p > 0,05$) (**Tabela 2.2**).

Para *P. brasiliensis*, as combinações de 0,25 ou 0,5 µg/mL de MLT com 32 µg/mL de TCZ apresentaram uma diminuição da viabilidade fúngica em comparação com MLT sem estar associada, mas as reduções não foram estatisticamente significativas.

2.4.3 Miltefosina induz alterações morfológicas em leveduras de *Paracoccidioides*

A morfologia normal das leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01) é caracterizada por um citoplasma eletro denso contendo um ou mais núcleos, mitocôndrias e alguns vacúolos bem como uma membrana celular e parede celular compacta (**Figuras 2.2 A, D e inserções**).

Notavelmente, as leveduras tratadas com concentração sub-inibitória de MLT (0,5 µg/mL) apresentaram alterações ultra estruturais na membrana citoplasmática (**Figuras 2.2 B e E**), inchaço mitocondrial (**Figuras 2.2 B, C e F**) e vacúolos (**Figuras 2.2 B, 2C e 2E**) bem como a presença de partículas eletro densas dentro de vacúolos (**setas negras nas Figuras 2.2 B, C, E e F**).

Tabela 2.2. Viabilidade das leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) após o tratamento de 7 dias à 37 °C de MLT associada ou não a concentração subinibitória de TCZ.

	Log UFC/mL média $\pm$ desvio padrão	
	<i>P. brasiliensis</i> (Pb18)	<i>P. lutzii</i> (Pb01)
Não tratado	5,99 $\pm$ 0,01	5,33 $\pm$ 0,76
TCZ 32	5,77 $\pm$ 0,07	5,26 $\pm$ 0,50
MLT 0,5	5,68 $\pm$ 1,22	4,92 $\pm$ 0,67
MLT 0,5/TCZ 32	3,81 $\pm$ 1,71	ND
MLT 0,25	5,95 $\pm$ 0,83	5,27 $\pm$ 0,71
MLT 0,25/TCZ 32	4,58 $\pm$ 1,04	3,83 $\pm$ 0,54

MLT: miltefosina; **TCZ:** triciclazol; **UFC:** unidades formadoras de colônia; **ND:** UFCs não detectadas

Figura 2.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) **(A-C)** e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) **(D-F)**. As leveduras foram tratadas com a concentração sub-inibitória de MLT (0,5 µg/mL) durante 14 dias à 37 °C. As leveduras controle, não tratadas **(A e D)** exibiram um citoplasma eletrodenso contendo um ou mais núcleos (**n**), mitocôndrias (**m**) e vacúolos (**v**), bem como uma parede celular compacta e membrana citoplasmática **(A e D)**. As leveduras tratadas com miltefosina **(B, C e E, F)** apresentaram alterações em suas membranas citoplasmáticas (**inserções em B e E**), acúmulo de vacúolos **(B, C e E)**, inchaço mitocondrial **(B, C e F)** e números de partículas eletrodensas dentro de vacúolos (estruturas semelhantes a melanossomas) (**setas em B, C, E e F**). Barras = 1 µm; Barras inseridas = 0,1 µm.

2.4.4 Estruturas tipo melanosoma em leveduras *Paracoccidioides* spp.

Análises adicionais de alta ampliação das imagens da microscopia eletrônica permitiram uma caracterização mais detalhada das partículas eletrodensas presentes dentro de vacúolos das leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01) tratadas com 0,5 µg/mL de MLT (**Figura 2.2**). Essas estruturas foram observadas em diferentes estágios de densidade de elétrons (**Figura. 2.3**) e apresentaram uma organização similar às estruturas tipo melanosoma descritas em conídios de *Fonsecaea pedrosoi*.

Observou-se uma matriz de tipo melanossoma na formação (**A**) e a maturação dos grânulos foi representada por um aumento na densidade eletrônica (**B e C**), que foi provavelmente seguida pela deposição de grânulos na parede celular fúngica (**D**). As estruturas tipo melanossoma foram quantificadas utilizando várias imagens de MET (100-200 leveduras foram analisadas para cada amostra). As leveduras não tratadas tinham um baixo número de estruturas semelhantes a melanossomas (0,12 estruturas/levedura de Pb18 e 0,13 estruturas/levedura de Pb01). O tratamento de MLT levou a um aumento significativo na produção de número de estruturas semelhantes a melanossomas dentro das células de levedura de *P. brasiliensis* (Pb18) (1,3 estruturas/levedura ou 10,8 vezes maior que o grupo não tratado) e *P. lutzii* (Pb01) (1,13 estruturas/levedura ou 8,7 vezes superior ao grupo não tratado).

2.4.5 Leveduras de *Paracoccidioides* spp. produzem melanina após a exposição de uma dose subletal de miltefosina

Para quantificar a produção de melanina produzida pelas leveduras após a exposição a dose subletal de MLT (0,5 µg/mL), as leveduras foram marcadas com o anticorpo anti-melanina e submetida ao citômetro de fluxo. O tratamento com a MLT resultou em um aumento de melanina presente nas leveduras de *P. brasiliensis* em 47% ($p < 0.01$), e de *P. lutzii* em 267% ($p < 0.001$), em relação ao controle (**Figura 2.4**). Por outro lado, a combinação da MLT (0,5 µg/mL) com TCZ (32 µg/ml) reduziu significativamente a produção de melanina comparada com o grupo que recebeu MLT sem estar associada a TCZ, resultando em níveis similares ao grupo controle (**Figura 2.4**).

Figura 2.3. Cortes ultrafinos de leveduras de *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) e *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18), numerosas estruturas tipo melanossoma em diferentes estágios de maturação. A matriz melanossômica em formação pode ser observada (A) e maturação de grânulos de melanina também pode ser observado devido à densidade crescente de elétrons (B e C). Os melanossomas aparecem próximos da membrana fúngica e depositados, possivelmente, na parede celular fúngica (D). Barras = 0,1 μm.

Figura 2.4. Média de intensidade de fluorescência de levedura de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) marcadas com anticorpo contra melanina 6D2. As leveduras não tratadas (C-) ou tratadas com concentrações subinibitórias de miltefosina (MLT 0,5 μg/mL) ou (0,5 μg/mL) combinadas com triciclazol (32 μg/mL) (MLT + TCZ) durante 14 dias à 37 °C. ** p < 0,01 e *** p < 0,001 em comparação com o C- (Anova-one way).

2.5 Discussão

O tratamento atual da PCM pode incluir longos períodos de terapêutica que varia de meses a anos, além de apresentar toxicidade e altas taxas de recidivas (1).

MLT é um fármaco de fosfolípido de alquilo, um análogo de fosfocolina, que dispõe tem um amplo espectro de atividade contra parasitas (123,124), leveduras, fungos filamentosos e leveduras dimórficas. (128–130,134). No presente estudo foi explorado pela primeira vez a atividade da MLT contra espécies de *Paracoccidioides*.

A MLT provou ser efetiva no controle do crescimento de isolados de *Paracoccidioides* spp. Apresentando uma faixa de CIM de 0,12 a 1 µg/mL, na qual foi igual ou similar a CIM encontradas para *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. (0,25 a 8 µg/mL) (135), dermatófitos do gênero *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* (0,25 a 2 µg/mL) (133), *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Fusarium* spp. and *Scedosporium* spp. (2 a 64 µg/mL) (146) e *Sporothrix* spp. (0,25 a 2 µg/mL) (128,130). Além de tudo, os valores da MCI da MLT foram também similares aos valores de CIM exibidas por drogas antifúngicas padrões como AMB e SMX-TMP. Assim como em estudos posteriores a MLT foi fungicida contra *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., *Sporothrix* spp., *H. capsulatum*, and *C. immitis*, (128–130,135), no presente estudo foi visto que a MLT também foi fungicida para *Paracoccidioides* spp.

A abordagem realizada para detectar as interações sinérgicas entre a MLT e as drogas antifúngicas usadas no tratamento da PCM (ITZ ou SMX-TMP) não foi satisfatória, na qual é consistente com a falta de sinergismo entre a MLT e azóis, como reportado para *S. brasiliensis* (130). Entretanto, sinergismos entre a MLT e voriconazol e posaconazol foi visto contra *F. oxysporum* e fungos Mucormycetes (146), assim como contra *F. solani*, *Scedosporium* spp. e *Aspergillus* spp. (132).

O tratamento subinibitório da MLT (0,5 µg/mL) inibiu aproximadamente 50% do crescimento de Pb01 (*P. lutzii*) e não teve algum efeito sobre a inibição de Pb18 (*P. brasiliensis*). Apesar disso, foi possível observar alterações ultra como vacúolos eletroluminosos, alterações morfológicas nas membranas citoplasmáticas e inchaço mitocondrial.

A presença de vacúolos eletroluminosos pode indicar o acúmulo de lipídios no citoplasma de *Paracoccidioides* spp. assim como também foi observado em leveduras

de *C. albicans* tratadas ou não com inibidores da biossíntese de ergosterol (147,148) e *S. brasiliensis* (130,135). Recentemente, foi visto que a MLT reduz ergosterol da membrana de *C. posadasii* e *H. capsulatum* (128) e também altera a permeabilidade da membrana citoplasmática de *C. posadasii*, *H. capsulatum*, e *S. brasiliensis*, na qual resulta no rompimento da membrana. (128–130).

A MLT tem sido associada com apoptose de *Saccharomyces cerevisiae*. O composto é rapidamente absorvido e penetra na membrana interna da mitocôndria de *S. cerevisiae*, onde interrompe o potencial da membrana e provoca a inibição dose-dependente da citocromo C oxidase, levando a morte celular por apoptose (146,149).

No presente trabalho, o inchaço mitocondrial das leveduras de *Paracoccidioides* spp. tratadas com MLT sugere que a MLT afeta a função mitocondrial, que possivelmente pode levar à perda de viabilidade fúngica. No entanto, o mecanismo de ação de MLT sobre células eucarióticas não é bem compreendido. Estudos sobre células tumorais e protozoários sugerem que MLT tem mais de um alvo e identificaram distúrbios das vias de sinalização celular dependentes de lipídeos (126,128,130,146,149,150). Deste modo, estes estudos sugerem que a MLT funciona concomitantemente ou sequencialmente através de um ou mais dos seguintes mecanismos: (i) um mecanismo de ação de tipo detergente que conduz à ruptura da membrana citoplasmática; (ii) alteração da biossíntese lipídica, e (iii) morte da célula de indução por apoptose (via mitocondrial).

Notavelmente, os nossos resultados sugerem que as concentrações sub-inibitórias de MLT (0,5 µg/mL) promovem um aumento na produção de melanina em levedura de *Paracoccidioides* spp. A análise de citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti melanina 6D2 corroborou ainda mais a nossa constatação de que as leveduras tratadas com MLT tinham um teor de melanina aumentado em comparação com as células não tratadas, o que é consistente com os resultados observados recentemente em *S. brasiliensis* (130).

Além disso, as leveduras expostas a MLT (0,5 µg/mL) apresentaram um aumento significativo no número de partículas eletrodensas dentro de vacúolos (tipo melanossoma), que possuem similaridade ultraestrutural com melanossomas descritos durante melanogênese em conídios de *Fonsecaea pedrosoi* (151). Esse processo de

disposição vesicular de estruturas tipo melanosomas também foi demonstrado em *C. neoformans* (152).

Recentemente, foi descrito em *A. fumigatus* e *A. nidulans* que a maquinaria de biossíntese de melanina (via DHN) é recrutada em endossomas e a melanina é depositada em forma de grânulos na parede celular pelo processo de exocitose (153). Melanina é polímero multifuncional encontrado em toda a natureza e pode ser sintetizada a partir de 1,8-di-hidroxinaftaleno (DHN) utilizando precursores de metabólitos da via acetato-malonato ou formados quando as células crescem na presença de compostos fenólicos, tais como 3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (154,155). Em *Paracoccidioides* spp., tanto os conídios quanto as leveduras podem sintetizar a melanina pelas vias DHN e L-DOPA, respectivamente (154,156). A melanização é uma resposta protetora para as leveduras de *Paracoccidioides* spp. (157). Uma vez que o meio de cultura MVM não é suplementado com substratos fenólicos, há hipótese de que MLT pode induzir a produção de melanina pela via DHN. Este postulado é fortemente apoiado pelo fato de que a combinação de MLT com TCZ, um inibidor específico da via DHN-melanina, resultou em uma diminuição na produção de melanina. Surpreendentemente, a nossa descoberta sugere que as concentrações sub-inibitórias de MLT modulam a produção de melanina na forma de levedura de *Paracoccidioides* spp. induzindo a via DHN.

2.6 Conclusão

- Foi demonstrado que a MLT exibiu um baixo valor de CIM e um potencial fungicida contra *Paracoccidioides lutzii* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Assim, a MLT se torna um promissor antifúngico no combate à PCM
- As combinações entre a MLT e antifúngicos foram indiferentes contra a inibição do crescimento de *Paracoccidioides* spp. Embora a associação de MLT com TCZ tenha sido indiferente, a combinação de concentrações subinibitórias de MLT e TCZ afetou a viabilidade dos fungos, especialmente para Pb01 (*P. lutzii*).
- O tratamento com a concentração subinibitória de MLT apresentou alterações ultra estruturais na membrana citoplasmática, inchaço mitocondrial e vacúolos bem como a presença de partículas eletro densas dentro de vacúolos.
- Foi observado a melanização das leveduras em concentrações sub inibitórias de MLT, uma resposta do fungo frente ao composto para se proteger.
- A melanização de *Paracoccidioides* pode ser induzida também pela via DHN.

CAPITULO 3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO COMPOSTO C7A CONTRA LEVEDURAS DE *CANDIDA ALBICANS* IN VITRO E IN VIVO

Nesse capítulo será exposto os resultados do estudo realizado em colaboração com a Profa. Dra. Elaine Guadalupe Rodrigues do Laboratório de Imunobiologia dos Tumores e do Envelhecimento do Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina e com o Dr. Julián Esteban Muñoz Henao, pós-doutorando do Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos

ARTIGO EM SUBMISSÃO.

Jornal: *Frontiers in Microbiology*

Título do artigo: Antifungal activity of the biphosphinic cyclopalladate C7a against *Candida albicans* yeast forms in vitro and in vivo

Autores: Julian E. Muñoz^{1,2+}, Diego C. Rossi¹⁺, Kelly Ishida³, Cristina C. Spadari³, Marcia S. Melhem⁴, Daniel M. Garcia⁵, Antonio Carlos F. Caires⁶, Carlos P. Taborda¹, Elaine G. Rodrigues⁷

⁺Ambos autores contribuíram igualmente

¹Department of Microbiology, University of São Paulo, Brazil

²Faculty of Health Sciences, Colegio Mayor de Cundinamarca University, Colombia

³Department of Microbiology, São Paulo University, Brazil

⁴Technical Division of Medical Biology, Adolfo Lutz Institute, Brazil

⁵Department of Pharmacology, Federal University of São Paulo, Brazil

⁶Interdisciplinary Center for Biochemical Investigation, Mogi das Cruzes University, Brazil

⁷Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo, Brazil

3.1 Introdução

3.1.1 Candidíases

As infecções fúngicas ocasionadas pelo gênero *Candida* são denominadas como candidíases, a espécie *albicans* é o principal agente etiológico. Porém, outras espécies podem ocasionar a doença, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* (158).

O gênero *Candida* compreende cerca de 150 espécies, estando presente em uma grande variedade de nichos ecológicos, sendo que a grande maioria possui características saprofíticas, dentre as quais algumas espécies fazem parte da microbiota humana e destas, somente 10% causam infecção. A reprodução ocorre de forma assexuada por brotamento (159).

Algumas espécies de *Candida* podem apresentar um estágio filamentoso com produção de hifas verdadeiras e pseudohifas. Esta mudança morfológica pode ocorrer tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo que esta característica possui implicações importantes na virulência e no diagnóstico do fungo. Além disso, em condições de cultivo *in vitro*, *C. albicans* podem produzir clamidoconídios que são estruturas de resistência formada por uma parede celular espessa e citoplasma condensado. Normalmente, estas estruturas são produzidas quando as leveduras são submetidas a condições de crescimento desfavoráveis (160).

Candida albicans é uma das espécies mais importantes, pois é responsável por um grande número de infecções principalmente, mas não exclusivamente, em pacientes que apresentam algum tipo de imunossupressão (158). Esta espécie possui fatores de virulência que auxiliam na infecção, como, por exemplo, a alteração do fenótipo de levedura para formas alongadas de crescimento, denominadas pseudo-hifas e hifas verdadeiras. As formas de hifas e pseudo-hifas são invasivas e penetram nos tecidos do hospedeiro, sendo o primeiro passo para a infecção. Esta levedura também tem a capacidade de secretar diversos tipos de enzimas, como proteinases e fosfolipases, que podem influenciar na sua virulência. Estas enzimas agem sobre os tecidos do hospedeiro e auxiliam na invasão. Além disso, a levedura possui a capacidade de adesão a diversos tecidos, e esta função é considerada muito importante nos estágios iniciais das infecções e está relacionada diretamente a seu grau de virulência. A adesão

é adquirida por meios específicos (expressão de adesinas) e inespecíficos (forças eletroestáticas e de van der Waals) (161).

A microbiota bacteriana afeta a colonização por *C. albicans* pela competição por nutrientes e pela produção de substâncias tóxicas que interferem na aderência das leveduras às células epiteliais do hospedeiro. Além disso, o sistema imune do hospedeiro controla a proliferação do fungo, bem como de outros microrganismos comensais (161).

A candidíase é a quarta doença mais comum em todo planeta entre as infecções sanguíneas nosocomiais superando infecções causadas por bactérias Gram- negativas. A frequência de infecções por *Candida* vem aumentando regularmente em hospitais do mundo todo (162). No Brasil, a candidíase foi a segunda micose que mais levou a óbito pacientes HIV/AIDS entre os anos de 1996 e 2006. As regiões Sudeste e Nordeste foram as que exibiram um maior número de mortes, e o estado que mais apresentou mortes por candidíase foi o Estado de São Paulo (17).

Esta doença pode apresentar um quadro agudo, subagudo ou crônico, podendo ainda ser superficial ou profundo/sistêmico, mas sempre de caráter oportunista. A doença induz a diversos quadros clínicos e compreendem inflamação, formação de pús e resposta granulomatosa. Os locais mais acometidos são as mucosas orofaríngeas e vaginais, a pele, brônquio, pulmão, trato gastrointestinal, rim, baço, fígado e coração. Além disso, a doença pode se tornar sistêmica (158). Ambas as estruturas morfológicas, filamentosas e levedureformes são encontradas nas infecções, onde normalmente as leveduras predominam. Entretanto, com o avanço da doença, ocorre o aparecimento das formas filamentosas, as quais são invasivas e resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro, em relação as leveduras, que apresentam maior susceptíveis. De forma geral as leveduras são responsáveis pelo início dos processos infecciosos, com as formas pseudo e filamentosas, respondendo por episódios invasivos (160).

Quando ocorre a ruptura do equilíbrio imunológico entre o hospedeiro e o fungo há uma multiplicação exacerbada e/ou invasão do fungo em tecidos, e se instala a infecção. Este desequilíbrio está associado a fatores de risco, tais como: neutropenia, hemodiálise, cirurgias, o uso indiscriminado de antibióticos, anticoncepcionais,

corticóides, queimaduras, quimioterapia, transplante de órgãos sólidos como rim e fígado, síndrome da imunodeficiência humana adquirida e diabetes (158).

A maioria das infecções por *Candida* são de origem endógena, sendo decorrentes da proliferação ou da mudança do sítio da levedura induzidos por algum fator de risco. No entanto, existe também a possibilidade de infecções exógenas em ambientes hospitalares, sendo que a levedura pode ser veiculada pelas mãos, aparelhos de ventilação, sondas e cateteres (163).

A candidíase vaginal ocupa o segundo lugar dentre as vaginites. Aproximadamente 75% das mulheres adultas apresentam, pelo menos, um episódio de candidíase vaginal em sua vida. As infecções por isolados não-*albicans* têm aumentado muito nos últimos anos. Clinicamente ambas as infecções, *albicans* e não-*albicans* são indistinguíveis, uma vez que causam sintomas muito semelhantes dentre eles leucorréia, fissuras, dor, prurido. O diagnóstico e o tratamento da candidíase vaginal resultam em um custo estimado de 1 bilhão de dólares por ano somente nos EUA (164).

A escolha do tipo de antifúngico assim como sua formulação é feita a partir do quadro clínico que o paciente desenvolve. As infecções cutâneas podem ser tratadas com vários cremes tópicos, loções, pomadas e supositórios a base de derivados azólicos (miconazol e cetoconazol). Para o tratamento da candidíase disseminada, desde 2004 a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas recomenda equinocandinas (caspofungina), derivados azólicos (fluconazol e itraconazol) e polienos (anfotericina B). Entretanto, novos antifúngicos estão sendo incluídos no tratamento como voriconazol, posaconazol e micafungina (165).

Os azóis pertencem a uma classe de antifúngicos que pode ser dividida de acordo com sua estrutura: imidazóis (duas moléculas de nitrogênio) e triazóis (três moléculas de nitrogênio). Entre os imidazóis somente o cetoconazol possui atividade sistêmica, contudo todos os triazóis têm atividades sistêmicas e incluem o fluconazol, itraconazol e voriconazol. Tanto os imidazóis como os triazóis inibem a biossíntese do ergosterol pela inibição da enzima 14- α -desmetilase do citocromo P-450, que é responsável pela demetilação do lanosterol. No entanto os triazóis apresentam uma maior seletividade pelo sítio de ação em relação aos imidazóis, devido ao acréscimo de nitrogênio em seu anel azólico. Além de aumentar a seletividade, o aumento de um

átomo de nitrogênio proporciona estabilidade metabólica, prolongando o tempo de meia vida plasmática dos triazóis. Dependendo do organismo e do azol empregado, a inibição da síntese do ergosterol resulta na inibição do crescimento da célula fúngica (fungistático) ou na morte celular (fungicida) (166).

As equinocandinas são uma nova classe de antifúngicos altamente seletivos de lipopetídeos que inibem a síntese das β -(1,3) glucanas, constituintes da parede celular fúngica. Tendo em vista que células de mamíferos não possuem β -(1,3) glucanas, esta classe de agentes se torna seletiva em sua toxicidade a fungos (167). Atualmente existem três equinocandinas no mercado: micafungina, caspofungina e anidulafungina, dentre estas somente a caspofungina está aprovada para o tratamento de candidíase (168).

Os polienos possuem a estrutura básica que consiste em um anel lactâmico, com uma cadeia lipofílica rígida contendo de três a sete ligações duplas e uma porção hidrofílica flexível sustentando vários grupos hidroxilas. Entre eles, temos a anfotericina B, que contém sete ligações duplas conjugadas, e pode ser inativada por calor, luz e extremos de pH. A anfotericina B é pouco solúvel em água e não é absorvida pela via de administração intramuscular ou oral. A formulação convencional da anfotericina B na administração intravenosa é a desoxicolato. As formulações lipídicas foram desenvolvidas na tentativa de evitar a natureza nefrotóxica da anfotericina B convencional. Dependendo da dose, a anfotericina B pode ter uma ação fungistática ou fungicida. Esta droga atua através da permeabilização da membrana plasmática, mas sua atividade, inicialmente, depende de sua ligação ao esterol da membrana. Essa ligação pode resultar na perda de íons intracelulares, o que caracteriza a natureza fungistática da droga. A anfotericina B em concentrações fungicidas pode levar a formação de poros na membrana, com conseqüente perda de constituintes celulares de baixo peso molecular e essa condição é irreversível (169).

Ao contrário dos mecanismos de resistência aos agentes antibacterianos, não existe evidência de que os fungos são capazes de inativar ou modificar os agentes antifúngicos como meio de adquirir resistência. Da mesma forma, os genes de resistência antifúngica não são transmissíveis de célula a célula como ocorre com muitos genes de resistência bacterianos. É evidente, entretanto, que bombas de efluxo

de multidrogas, alteração do alvo e super expressão do alvo sejam mecanismos importantes na aquisição de resistência aos agentes antifúngicos (170).

A utilização profilática dos azóis, especialmente do fluconazol, no tratamento e na prevenção de infecções por *Candida* aumentou a ocorrência de resistência do fungo a este antifúngico. A resistência da *Candida* frente aos derivados azólicos ocorre pelos seguintes mecanismos: mutação do gene (ERG11) que codifica a enzima 14- α -desmetilase, modificando o alvo de ação do antifúngico não havendo, assim, interação com a droga. Ainda, a super expressão do gene (ERG11) resulta na produção excessiva da enzima alvo, criando a necessidade de maiores concentrações da droga dentro da célula. Além disso, a super expressão dos genes CDR1 e CDR2, que codificam bombas de efluxo de multidrogas, e o gene BENr codifica bombas de efluxo específicas para o fluconazol (170).

Os isolados de *Candida* resistentes a equinocandinas são bastante raros. Os mecanismos de resistência são diretamente ligados a mutações do gene FKS1, que codifica β -1,3-D-glucana sintetase. Esta enzima faz parte de um complexo enzimático responsável pela síntese das β -(1,3) glucanas (168).

O mecanismo de resistência que a *Candida* exerce sobre a anfotericina B é pouco conhecido, mas provavelmente o aumento ou a diminuição de ergosterol na membrana do fungo está associado à resistência fúngica. Já foi mostrado que isolados de *Candida* resistentes apresentam uma diminuição de ergosterol em relação aos isolados suscetíveis. Esta deficiência de ergosterol pode ser resultado de mutações em genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de ergosterol. Também há a possibilidade de substituições de esteróis que ligam polienos (ergosterol) por aqueles que apresentam uma afinidade menor pelos polienos (fecosterol) (170,171).

3.1.2 C7a

Os agentes quimioterápicos baseados em metais de transição são muito eficazes contra tumores, especialmente os do grupo da platina, no entanto eles também mostram uma toxicidade extremamente alta. Na procura de fármacos alternativos contendo um metal de transição do mesmo grupo, mas mostrando menor toxicidade e um espectro mais amplo de atividade para o tratamento contra o câncer, foi

demonstrado que os complexos de paládio (II) eram opções promissoras *in vitro*. Contudo, devido à sua extrema labilidade nos fluidos biológicos, foram avaliadas modificações na estrutura química. A geração de compostos ciclopaladados utilizando reações de ciclometalação aumentou a estabilidade e diminuiu a toxicidade destes compostos (172). A complexação de ciclopaladados com o grupo bifosfínico diminuiu significativamente a labilidade desses compostos em ambiente biológico formando complexos estáveis, permitindo o uso de doses baixas e consequentemente reduzindo sua toxicidade (173). Um destes complexos, o ciclopaladado bifosfínico C7a, mostrou uma forte atividade *in vitro* e *in vivo* contra melanoma murino, várias células tumorais humanas (173,174) e em um Modelo de Xenoenxerto de células T mimetizando leucemia /linfoma (175). Curiosamente, C7a também foi eficaz *in vitro* e *in vivo* contra modelos experimentais de *T. cruzi* (176) e *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. *In vitro*, o complexo C7a reduziu as contagens de UFC de *C. neoformans* e *C. albicans* (177).

3.2 Objetivos

3.2.1 Geral

Considerando que o C7a possui uma atividade biológica contra células tumorais, *Trypanosoma cruzi* e *Paracoccidioides brasiliensis*, o presente trabalho visa expandir os estudos antifúngicos dessa molécula. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade do composto C7a *in vitro* contra espécies de *Candida* spp., assim como averiguar se o C7a possui atividade terapêutica em um modelo de candidíase sistêmica e vaginal.

3.2.2 Específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima do composto C7a e drogas antifúngicas para isolados de *Candida* spp..
- Examinar o efeito do tratamento do composto C7a na formação de biofilmes maturados ou não de *Candida albicans*.
- Analisar morfológicamente os efeitos do composto C7a nas leveduras tratadas.
- Observar o desempenho do composto C7a nos modelos de candidíase sistêmica e vaginal em camundongos imunossuprimidos.

3.3.1 Microorganismos

Os isolados de *Candida* resistente ao antifúngico fluconazol foram cedidos pela Dr. Márcia de Souza Carvalho Melhem do Instituto Adolfo Lutz: *Candida albicans* (n=14), *Candida parapsilosis* (n= 9), *Candida tropicalis* (n=10), *Candida glabrata* (n=10) and *Candida krusei* (n=10). As cepas padrão *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 200956, *C. glabrata* ATCC 2001 and *C. krusei* ATCC 6258 foram incluídas no trabalho.

A cepa *Candida albicans* ATCC 10231 foi utilizada nos estudos de biofilme, e ensaios *in vivo*. Todas as cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose à 4 °C e subcultivadas duas vezes no mesmo meio à 37 °C 24 horas antes de cada ensaio.

3.3.2 Composto ciclopaladado

O complexo ciclopaladado C7a foi sintetizado a partir de N, N-dimetil-1-fenetilamida (dmpa), e complexado a 1,2 etano bis (difenilfosfina, dppe) ligando, como descrito anteriormente(173). O composto foi diluído até a concentração final de 10 mM em DMSO e para ensaios *in vivo* e *in vitro* o composto foi diluído até à concentração final em meio ou PBS.

3.3.2 Antifúngicos

Foram utilizados três agentes antifúngicos de referência: anfotericina B (AMB, Sigma Chemical Co., EUA) diluída em DMSO para obter uma concentração de 1,600 µg/mL, miconazol (MCZ, Sigma Chemical Co. EUA) diluído em DMSO para se obter uma concentração de 1,600 mg/mL e fluconazol (FCZ, Pfizer, São Paulo, Brasil) diluído em água estéril para obter 2.560 µg/mL. As soluções estoques foram armazenadas a -20 °C.

Para aplicação tópica nos ensaios *in vivo*, o creme vaginal (emulsificante não iônico de cera a 10%, 2% de óleo mineral, 5% de propilenoglicol e água destilada a 84%, pH 4,5) foi preparado com a incorporação de 2% de MCZ (178).

3.3.3 Ensaio de susceptibilidade antifúngica sobre células planctônicas de *Candida* spp.

O teste de susceptibilidade antifúngica foi realizado de acordo com o documento M27-S4 do CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute) (179). As concentrações testadas para o C7a foram 0,125-64 µg/mL, FCZ 0,125-64 µg/mL e para MCZ e AMB 0,03-16 µg/mL.

O crescimento fúngico foi determinado por um leitor espectrofotométrico de placas (Spectra MAX 340 Tunable Microplate Reader, Molecular Devices Ltd. USA) a 492nm. Após a leitura, alíquotas de 10 µL foram coletadas de cada poço da placa e transferidas para um meio de cultura limpo (Sabouraud dextrose agar) e incubado à 35 °C por 48 horas para determinar a concentração fungicida mínima (CFM). A CFM foi definida como a menor concentração que falhou em inibir o crescimento fúngico.

3.3.4 Microscopia de fluorescência com calcofluor

Candida albicans ATCC 10231 (1000 UFC/mL) foi tratada com o IC₅₀ de C7a (0.5 µg/mL) por 24 a 35 °C em meio RPMI 1640 com 0.16 M de MOPS. Após esse período, células tratadas ou não com C7a foram lavadas em PBS, pH 7,2 e fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS por 30 minutos, e aderidas a lamínulas de vidro, coberto com poli-L-lisina e coradas com calcofluor-white 1 mg/mL (Sigma-Aldrich) por 5 min. As lamínulas foram lavadas e montadas em solução de n-propil galato e observados ao microscópio EVOS fl (AMG; Mill Creek, WA, EUA).

3.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a microscopia eletrônica convencional, as leveduras tratadas com o composto C7a (concentração subinibitória) foram fixadas durante 2 h à temperatura ambiente com 2,5% de glutaraldeído e 4% de formaldeído preparado em tampão de cacodilato 0,1 M (pH 7,2) durante 1 h. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão de cacodilato contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio e CaCl₂ a 5 mM durante 2 horas. Em seguida, as células foram desidratadas em acetona e

incorporadas em Epon. As secções ultrafinas foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas em um microscópio Zeiss CEM-900electron.

3.3.6 Concentração inibitória para biofilmes de *C.albicans*

A concentração antifúngica mínima que inibiu tanto a formação de biofilme quanto a viabilidade de células de biofilme pré-formadas foi definida como descrito anteriormente (180).

Para avaliar o efeito do C7a e drogas antifúngicas na prevenção da formação de biofilmes, foram adicionados 50 µL de cada fármaco diluído em série em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., Missouri, EUA), tamponado com 1,6 M MOPS pH 7,0, em poços de placas 96 poços contendo 50 µL de 2×10^6 células/mL. Para avaliar a eficácia dos fármacos contra os biofilmes pré-formados, os biofilmes foram cultivados durante 24 horas, seguido por uma suave lavagem e foram adicionados 100 µL do fármaco diluído em série. Após a adição de fármacos, as placas foram seladas com *parafilm* e incubadas à 37 °C durante 24 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas duas vezes com PBS para remover as células não aderentes. O teste de viabilidade XTT foi realizado para determinar a eficácia dos fármacos. As experiências dose-resposta foram realizadas em quadruplicada a cada dose em duas placas diferentes.

3.3.7 Estudos *in vivo*

Os camundongos isogênicos BALB/c (fêmeas de 6 a 8 semanas) foram criados e mantidos nos Biotérios da Faculdade de Medicina e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), em condições específicas sem patógenos. Os procedimentos envolvendo animais e seus cuidados foram conduzidos de acordo com o comitê de ética local e as normas internacionais, e todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Para a imunossupressão de animais, doses de 100 mg/kg de ciclofosfamida foram administradas intraperitonealmente (ip) 4 dias e 1 dia antes da infecção com *C.*

albicans, e novamente no terceiro dia após a infecção e, a partir deste ponto, a cada 4 dias até o fim do tratamento (178).

Os animais foram mantidos em microisoladores, e servidos com alimentos autoclavados e água, a fim de manter um ambiente estéril. As gaiolas foram trocadas duas vezes por semana em coberturas de fluxo laminar.

Os animais foram considerados anérgicos quando se verificou que o número de leucócitos era inferior a 100 células/mm³ (181).

Para a realização do modelo de candidíase vaginal, foi induzida a fase de pseudo-estro por administração subcutânea de 0,5 mg de valerato de 17 beta-estradiol (Sigma Chemicals, St Louis) dissolvido em óleo de sésamo (Sigma Chemicals, St Louis) 3 dias antes da infecção vaginal (182).

3.3.8 Modelo experimental

Uma colônia de *C. albicans* (isolado ATCC 10231) foi selecionada a partir de uma placa de ágar Sabouraud dextrose e incubada em infusão de coração e cérebro (Oxoid, Inglaterra) à 37 °C durante 24 horas com agitação de 200 RPM. O sedimento obtido por centrifugação a 500 g durante 5 minutos foi lavado três vezes em PBS e ressuspenso em 5 mL de PBS. O número de leveduras por mL nesta suspensão foi determinado por câmara de Neubauer. A viabilidade do inóculo foi determinada por coloração com azul de Tripán e verificou-se ser superior a 90%.

O modelo imunossuprimido de candidíase foi induzido por injeção intravenosa de 10⁴ leveduras suspensas em 100 µL de PBS. Já o modelo de candidíase vaginal foi induzido pela inoculação de 3 × 10⁶ de levedura suspensas em 10 µL de PBS.

3.3.9 Análise da carga fúngica em órgãos de camundongos infectados

Os camundongos foram sacrificados 7 dias após a infecção, rins ou vaginas foram removidos, pesados, homogeneizados e depois lavados. Os sedimentos correspondentes foram novamente suspensos e homogeneizados em 1 ml de PBS. 100 µL destas suspensões foram inoculadas em meio de agar infusão coração e cérebro. As contagens de colônias foram feitas visualmente após 24 horas de incubação à 37 °C.

Todos os experimentos foram feitos com três réplicas biológicas com grupos com no mínimo cinco animais.

3.3.10 Histologia

O canal vaginal foi excisado, fixado em formalina tamponada a 10% e incorporado em parafina para seccionamento após 7 dias de infecção. As secções foram coradas com ácido periódico Schiff de (PAS) e examinadas microscopicamente a 10X (Optiphot-2, Nikon, Tóquio, Japão).

3.3.11 Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). As comparações foram feitas pelo teste de variação (one-way ANOVA) seguido do pós teste de Tukey-Kramer. Quando os valores de P foram $< 0,05$ foi constatado diferença estatística significativa. No caso das curvas de morte foi utilizado o teste Log-rank (Mantel–Cox), quando valores de P foram $\leq 0,001$ foi constatado diferença estatística significativa. Foi determinado um intervalo de confiança de 95% em todas as experiências.

3.4 Resultados

3.4.1 Atividade antifúngica *in vitro*

A sensibilidade dos isolados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* ao C7a *in vitro* está compilada nas **tabelas 3.1, 3.2 e 3.3**.

Na **tabela 3.1**, podemos observar a faixa de concentração inibitória do C7a e das drogas antifúngicas contra os isolados clínicos de *Candida* spp. C7a e AMB exibiram a faixa de inibição para todos os isolados entre: 0,25 – 4 µg/mL e 0,125 – 16 µg/mL, respectivamente. MCZ e o FCZ mostraram faixas de 0,003 – 16 µg/mL e 0,03 – >64, respectivamente. A faixa de CIM que os antifúngicos MCZ e FCZ exibiram, representa uma inconsistência na CIM que estas drogas exercem em todos os isolados, de forma diferente do C7a e da AMB que apresentam valores similares de CIM entre si para todos os isolados. Interessantemente, C7a se mostra ativo contra isolados que possuem resistência a FCZ (**Tabela 3.2**). A **tabela 3.3** mostra o percentual cumulativo da MCF do C7a e da AMB. Considerando todas as espécies de *Candida* o C7a conseguiu matar 11,5% das leveduras na concentração de 0,25 µg/mL, a AMB começou a exibir efeito em uma concentração duas vezes maior. É importante destacar que o C7a foi muito mais eficiente contra *C. albicans* que a AMB, uma vez que nas concentrações de 0,25 µg/mL e 1 µg/mL o composto apresentou 41,2% e 100% de mortalidade, respectivamente, enquanto que a AMB foi ativa em 11,7% dos isolados a 0,5 µg/mL, sendo que 100% de mortalidade foi vista em concentrações maiores que 16 µg/mL. Entretanto a AMB foi mais eficiente em isolados de *C. parapsilosis*. Para as demais espécies os dois compostos mostraram eficiência similares.

Tabela 3.1. Valores da faixa de concentração inibitória mínima (CIM) do composto C7a em comparação com anfotericina B (AMB) e agentes azólicos miconazol (MCZ) e fluconazol (FCZ) sobre isolados clínicos de *Candida* spp.

Cepas	Drogas antifúngicas	Concentração (µg/mL)		
		Faixa de CIM	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Todas as espécies	C7a	0,25 - 4	1	4
	AMB	0,125 - 16	1	1
	MCZ	0,03 - >16	0,25	4
	FCZ	0,03 - >64	1	>64
<i>Candida albicans</i>	C7a	0,25 - 1	0,5	1
	AMB	0,5 - 1	1	1
	MCZ	0,03 - 4	0,03	0,5
	FCZ	0,03 - >64	0,25	64
<i>Candida tropicalis</i>	C7a	0,5 - 2	1	2
	AMB	0,5 - 2	1	2
	MCZ	0,06 - 8	0,5	8
	FCZ	0,25 - >64	1	64
<i>Candida parapsilosis</i>	C7a	1 - 4	2	4
	AMB	0,5 - 1	1	1
	MCZ	0,06 - 4	0,25	4
	FCZ	0,06->64	1	16
<i>Candida glabrata</i>	C7a	0,25 - 4	1	2
	AMB	0,125 - 2	0,5	1
	MCZ	0,03 - 16	0,03	0,5
	FCZ	0,25 - >64	2	8
<i>Candida krusei</i>	C7a	1	1	1
	AMB	0,5 - 1	0,5	1
	MCZ	2 - 8	4	8
	FCZ	64 - >64	64	>64

Tabela 3.2. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto C7a comparados com antifúngicos padrões - anfotericina B (AMB), miconazol (MCZ) e fluconazol (FCZ) – sobre cepas padrão e isolados clínicos de *Candida* spp. Valores de MIC e MFC estão em µg/mL.

	C7a		AMB		MCZ		FCZ	
Cepas	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Candida albicans</i> (n=17)								
SC 5314	0,5	0,5	1	>16	0,031	>16	0,25	>64
ATCC 10231	1	1	0,5	1	4	>16	0,5	>64
ATCC 24433	1	1	1	2	0,5	>16	0,5	>64
IAL-40	0,5	2	1	1	2	>16	64 ^R	>64
IAL-41	0,25	0,25	1	1	0,031	>16	64 ^R	>64
IAL-42	0,5	0,5	0,5	0,5	0,125	1	64 ^R	>64
IAL-43	0,5	0,5	0,5	0,5	0,031	>16	0,031	>64
IAL-47	0,25	0,25	1	1	0,062	8	0,25	64
IAL-48	0,25	0,25	1	1	0,031	>16	0,25	>64
IAL-49	0,5	0,5	1	1	0,031	>16	0,25	>64
IAL-50	0,5	0,5	1	1	0,031	>16	0,25	>64
IAL-51	0,5	0,5	1	1	0,031	>16	0,25	>64
IAL-52	0,25	0,25	0,5	>16	0,031	2	0,25	>64
IAL-53	0,25	0,25	0,5	>16	0,031	>16	0,25	>64
IAL-54	0,5	0,5	0,5	>16	0,031	8	0,5	>64
IAL-55	0,25	0,25	0,5	>16	0,031	>16	0,125	>64
IAL-56	0,25	0,25	0,5	>16	0,031	4	0,125	>64
<i>Candida tropicalis</i> (n=12)								
ATCC200956	0,5	2	>16 ^R	>16	>16	>16	16 ^R	>64
ATCC28707	0,5	0,5	2 ^R	>16	4	8	>64 ^R	>64
IAL-1	2	2	1	1	0,5	2	0,5	>64
IAL-2	2	2	1	1	0,5	2	1	>64
IAL-3	1	1	1	1	4	>16	4 ^{SDD}	>64
IAL-4	1	1	1	1	8	>16	64 ^R	>64
IAL-5	1	1	1	1	0,5	>16	0,25	32
IAL-6	1	>16	1	1	0,25	2	0,5	>64
IAL-7	1	1	0,5	1	0,062	8	0,25	>64
IAL-8	1	1	1	1	8	>16	8 ^R	>64
IAL-9	1	1	1	1	0,25	>16	1	>64
IAL-10	0,5	0,5	1	1	0,062	4	0,25	>64
<i>Candida parapsilosis</i> (n=10)								
ATCC22019	1	>16	0,5	2	4	>16	1	16
IAL-11	4	4	1	2	0,125	1	1	8
IAL-12	4	4	1	2	0,25	1	0,5	2
IAL-13	2	8	1	4	0,5	8	0,5	8
IAL-14	1	4	0,5	0,5	0,062	0,5	1	4
IAL-15	2	8	1	2	1	2	16 ^R	>64
IAL-16	4	4	1	2	0,062	0,25	0,062	0,5
IAL-17	4	16	1	1	4	>16	64 ^R	>64
IAL-18	4	16	0,5	1	1	>16	8 ^R	>64
IAL-19	1	1	1	1	0,062	2	0,5	36

<i>Candida glabrata</i> (n=11)								
ATCC 2001	2	>16	0,125	4	16	>16	8	>64
IAL-20	0,5	0,5	1	1	0,06	8	2	>64
IAL-21	0,25	0,5	2 ^R	2	0,03	4	1	>64
IAL-22	1	1	1	1	0,03	8	0,25	>64
IAL-23	1	1	0,5	1	0,03	2	>64 ^R	>64
IAL-24	1	1	0,5	1	0,03	8	1	>64
IAL-25	1	1	1	1	0,06	>16	2	>64
IAL-26	4	4	1	2	0,5	2	0,25	2
IAL-27	1	1	0,5	1	0,06	>16	4	>64
IAL-28	1	1	0,5	1	0,03	>16	0,25	>64
IAL-29	0,5	1	0,5	0,5	0,03	8	2	64
<i>Candida krusei</i> (n=11)								
ATCC 6258	1	>16	0,25	2	>16	>16	64 ^R	>64
IAL-30	1	2	0,5	0,5	2	>16	64 ^R	>64
IAL-31	1	1	0,5	0,5	2	>16	>64 ^R	>64
IAL-32	1	1	0,5	0,5	4	>16	>64 ^R	>64
IAL-33	1	1	0,5	0,5	8	>16	>64 ^R	>64
IAL-34	1	1	0,5	1	2	>16	>64 ^R	>64
IAL-35	1	1	1	1	2	>16	64 ^R	>64
IAL-36	1	1	1	2	2	>16	64 ^R	>64
IAL-37	1	1	1	1	4	>16	64 ^R	>64
IAL-38	1	1	1	1	4	>16	64 ^R	>64
IAL-39	1	1	1	1	4	16	64 ^R	>64

R –

Isolados resistentes

Tabela 3.3. Porcentagem cumulativa da concentração fungicida mínima (CFM) do composto C7a e Anfotericina B (AMB) sobre isolados clínicos de *Candida* spp.

		Porcentagem cumulativa (%)								
CFM (µg/mL)		0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
Todas as espécies	C7a		11,5	31,2	72,2	78,7	86,9	90,2	93,5	100
	AMB			13,1	67,1	83,5	86,8	86,8	86,8	100
<i>C. albicans</i>	C7a		41,2	88,1	100					
	AMB			11,7	58,7	64,5	64,5	64,5	64,5	100
<i>C. parapsilosis</i>	C7a				10	10	50	70	90	100
	AMB			10	40	90	100			
<i>C. tropicalis</i>	C7a			16,6	66,6	91,6	91,6	91,6	91,6	100
	AMB				83,3	83,3	83,3	83,3	83,3	100
<i>C. glabrata</i>	C7a			18,1	81,7	81,7	90,7	90,7	90,7	100
	AMB			9	72,6	90,7	100			
<i>C. krusei</i>	C7a			0	81,8	90,8	90,8	90,8	90,8	100
	AMB			36,3	81,7	100				

3.4.2 Alterações morfológicas de *C. albicans* tratadas com C7a

O tratamento das leveduras de *C. albicans* com uma concentração subinibitória (0,5 µg/mL) de C7a (IC₅₀) causou efeitos morfológicos. Foi feita uma quantificação de leveduras e hifas/pseudohifas e foi constatado que nas células não tratadas (total de 316) havia 90,7% (283) hifas/pseudohifas e 10 vezes menos levedura, 9,3% (29). O tratamento com C7a conseguiu inibir a formação de hifas/pseudohifas pois, após o tratamento, foi observado apenas 43,83% (148) de hifas/pseudohifas, e 53,17 % de leveduras (168) (**Figura 3.1 E**).

Essa inibição de produção de hifas/pseudohifas foi corroborada por microscopia utilizando calcofluor White, onde as células não tratadas apresentaram coloração na porção final das hifas/pseudohifa (**setas Figura 3.1 B**), e células tratadas com C7a apresentaram coloração somente na levedura (**Figura 3.1 D**).

Os efeitos morfológicos do tratamento com a IC₅₀ de C7a também foram avaliados utilizando microscopia eletrônica de transmissão, que mostrou importantes alterações em algumas organelas e estruturas que podem ser alvos potenciais. As leveduras tratadas com concentrações sub-inibitórias de C7a, durante 24 h à 35 °C, exibiram parede celular desagregada e várias invaginações na membrana citoplasmática (**Figura 3.2 B, C e D**). Além disso, observou-se maior número de vacúolos, alterações do DNA e inchaço mitocondrial.

3.4.3 C7a inibe a formação de biofilme e biofilmes maduros de *C. albicans* in vitro

A concentração mínima de C7a necessária para começar a afetar o biofilme maduro (**Figura 3.3 A**) e a formação de biofilme (**Figura 3.3 B**) foi de 1 µg/mL. No entanto, a anfotericina B requereu uma concentração 8 vezes menor para afetar o biofilme maduro e 4 vezes menos para a formação de biofilme.

Figura 3.1. Leveduras de *Candida albicans* ATCC 10231 foram tratadas com concentração sub-inibitória do composto C7a (0,5 µg/mL) por 24 h a 35 °C em meio RMPI 1640 tamponado com MOPS 0,16 M. Após este período, células não tratadas (**A-B**) e tratadas com C7a (**C-D**) foram coradas com calcofluor White e leveduras e hifas/pseudohifas foram quantificadas (**E**). Podemos observar que o composto C7a foi capaz de inibir a formação de hifas/pseudohifas, a partir de quantificação feita por microscopia ótica. Barras = 20 µm.

Figura 3.2. Microscopia eletrônica de transmissão de levedura de *Candida albicans* ATCC 10231 não tratada (**A**) e tratada com concentração subinibitória de C7a (0,5 µg/ml) (**B, C e D**) durante 24 horas a 35 °C em RPMI 1640 tamponado com MOPS 0 16 M. Seta indica a marginalização de DNA. **N**: núcleo; **M** = mitocôndria; **V** = vacúolo. Barras = 1 micrómetro.

Figura 3.3 Efeito do composto C7a e anfotericina B no biofilme maduro **(A)** e na maturação do biofilme **(B)** de *C. albicans*. O ensaio foi realizado pelo método de XTT. Área em vermelho indica o limite negativo (D.O do branco e positivo (D.O do biofilme não tratado). * Teste *t* Two tailed comparado com o controle positivo, $P < 0,05$.

3.4.4 Avaliação da atividade antifúngica do C7a *in vivo*

Camundongos fêmeas BALB/c receberam uma dose de 10 µg do composto C7a i.p, a cada 24 horas por 7 dias. Após esse tempo, a carga fúngica foi avaliada contando as UFCs dos rins recuperados. O tratamento mostrou uma redução significativa ($P \leq 0,05$) na carga fúngica quando comparado com o grupo de camundongos infectados não tratados (**Figura 3.4**). Além disso, foi necessária uma dose duas vezes maior de fluconazol para obter o mesmo resultado que o composto C7a (**Figura 3.4**).

O tratamento da candidíase vaginal com o creme contendo C7a a 2,5% resultou em uma diminuição da carga fúngica, embora não tenha sido significativa. Entretanto, o creme de C7a a 5% e MCZ 5% exibiram uma diminuição significativa das colônias nas vaginas dos animais em relação ao grupo controle não tratado (**Figura 3.5**). Para corroborar, é possível observar o controle na infecção feita pelo tratamento com o creme de 5% de C7 e MCZ na análise histopatológica realizadas em tecido do canal vaginal (**Figura 3.6 B e C**).

Além disso, foi avaliado o efeito do tratamento com C7a na sobrevivência de animais imunossuprimidos infectados com *C. albicans*. O grupo de animais infectados que receberam PBS (infectado) atingiu 100% de mortalidade 21 dias após a infecção. O grupo tratado com FCZ (20 µg/kg) não apresentou morte em 30 dias, e o grupo tratado com C7 (10 µg/kg) atingiu 78% de sobrevivência em 30 dias (**figura 3.7**).

Figura 3.4. Tratamento de camundongos infectados com a cepa ATCC 10231 de *C. albicans*. A avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama foi realizada a partir dos rins dos animais. A candidíase disseminada foi induzida por uma injeção intravenosa de 3×10^5 leveduras suspensas em 100 μ L de PBS. O tratamento foi realizado a cada 24 horas durante sete dias após a infecção. Os animais foram tratados com 10 μ g de C7a e 20 μ g de fluconazol (FCZ). Como controle, os animais infectados receberam apenas PBS. * Indica significância estatística (ANOVA com teste pós-Tukey, $P < 0,05$).

Figura 3.5. Tratamento de camundongos infectados com a cepa ATCC 10231 de *C. albicans*. Avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido foi realizada nas vaginas dos animais. A candidíase vaginal foi realizada inoculando 3×10^6 leveduras suspensas em 20 μ L de PBS. O tratamento foi realizado a cada 24 horas durante sete dias. Os animais foram tratados com cremes a 2,5% e 5% de C7a, e 2% de miconazol (MCZ). Como controle, os animais infectados receberam apenas PBS em creme. * Indica significância estatística (ANOVA com teste pós-Tukey, $P < 0,05$).

Figura 3.6. Cortes histológicos do canal vaginal de camundongos BALB / c infectados com *C. albicans* ATCC 10231 e tratados com MCZ (2%) ou composto C7a (5%). **(A)** animais infectados e tratados somente com o veículo, **(B)** animais infectados e tratados com MCZ, **(C)** animais infectados e tratados com composto C7a. Coloração de PAS com o aumento de 10X.

Figura 3.7. Sobrevivência de camundongos imunossuprimidos com candidíase disseminada. Os animais foram tratados com 100 mg/kg de ciclofosfamida e infectados com 10^4 leveduras de *C. albicans* ATCC 10231. O tratamento foi feito com 10 µg/Kg de C7a, 20 µg/kg de fluconazol (FCZ). Como controle, os animais infectados receberam somente PBS. * Indica a significância estatística (teste de Longo-Rank, $P < 0,05$).

3.5 Discussão

A candidíase está entre as infecções nosocomiais mais importantes em todo o planeta, e as infecções apresentam um aumento frequente em todos os hospitais do mundo (153). A representatividade da candidíase no Brasil é bem significativa, sendo a segunda micose que mais matou pacientes HIV positivos entre os anos de 1996 e 2006 (17).

C7a é um complexo ciclopaladado biofosfínica que em baixas concentrações exibe atividade antitumoral, antiparasitária e antifúngica. Em células tumorais, o composto C7a induz apoptose por dissipar o potencial de membrana de mitocôndria, assim ativando caspases causando degradação e condensação do DNA (164–166). Em *Trypanosoma cruzi*, o composto provoca morte celular através disfunção mitocondrial (173). Em *P. brasiliensis* e *P. lutzii* o composto C7a promove apoptose e morte celular e foi efetivo no controle do crescimento do fungo no pulmão de camundongos (167). Estudos indicaram que isolados de *C. albicans* e *C. neoformans* também foram sensíveis ao C7a (167).

Neste capítulo avaliamos a atividade antifúngica do composto C7a contra 56 isolados *Candida* spp. *in vitro* e nos modelos experimentais de candidíase sistêmica e vaginal.

A sensibilidade de várias espécies de *Candida* foi analisada *in vitro* contra o C7a. Nestes estudos o C7a foi comparado com drogas antifúngicas que fazem parte do repertório terapêutico da candidíase. O C7a se mostrou muito mais eficiente, assim como a AMB, em inibir o crescimento das leveduras do que FCZ e MCZ, uma vez que exibiu uma faixa de CIM muito menor (**tabela 3.1**). Apesar que o MCZ exibiu uma baixa CIM para alguns isolados, a droga também obteve uma CIM alta para outros isolados (**tabela 3.2**). Isto mostra a variabilidade de ação que o MCZ exerce sobre todos os isolados testados. O C7a, por sua vez, não apresenta uma variabilidade de ação. Surpreendentemente, O C7a foi capaz de inibir o crescimento de isolados de diferentes espécies resistente ao FCZ, um dos antifúngicos mais empregados do controle da candidíase (**tabela 3.2**). Trabalhos anteriores também demonstraram a eficácia do complexo C7a contra os isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* *in vitro* em baixas concentrações (MIC₅₀ de 0,04 a 0,43 µg / ml) (167). O potencial fungicida do C7a foi

equivalente ao da AMB. Contudo, o C7a foi muito melhor ao matar leveduras de *C. albicans* (tabela 3), a espécie que esta mais frequente associada às infecções por leveduras do gênero *Candida* (149).

A capacidade de *C. albicans* de infectar diversos nichos é suportada por uma ampla gama de fatores de virulência e atributos, como transição morfológica entre formas de levedura e hifas, expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, formação de biofilmes, Secreção de enzimas hidrolíticas, flexibilidade metabólica, entre outros (174).

Foi avaliado o efeito do complexo C7a em um destes mecanismos, a produção de hifas/pseudo-hifas por *C. albicans*. Através da coloração branca de calcofluor, observou-se que C7a diminuiu significativamente (em 40%) a formação *in vitro* de hifas e pseudo-hifas de *C. albicans* (**Figura 3.1 E**).

O grupo controle não tratado apresentou uma coloração intensa com calcofluor branco nas pontas das hifas, o que significa que estas regiões são ricas em quitina e estão em fase de crescimento (175). Por outro lado, a coloração branca de calcofluor estava presente apenas na célula de levedura mãe e não nas pseudo-hifas no grupo tratado com C7a, indicando que o composto inibiu a formação de hifas e / ou pseudo-hifas e mesmo quando estas estruturas foram formadas não estavam crescendo ativamente (**Figura 3.1 A-D**).

Outro importante fator de virulência das espécies de *Candida* é a formação de biofilme (176). A infecção de biofilmes ocorre em mais de 50% dos cateteres utilizados em hospitais nos EUA estimando 100.000 mortes e 6,5 bilhões de dólares por ano. Uma vez que os biofilmes fúngicos são, em grande parte, resistentes aos fármacos antifúngicos atuais, são necessárias doses antifúngicas elevadas juntamente com a remoção do dispositivo médico colonizado para tratar infecções. A remoção de alguns dispositivos por exemplo, válvulas cardíacas artificiais e articulações, é dispendiosa e, em alguns casos, perigosa, e a administração de doses elevadas de agentes antifúngicos pode causar complicações, incluindo danos nos rins e no fígado (177). Para avaliar o efeito do complexo C7a sobre este fator de virulência de *C. albicans*, utilizou-se uma abordagem dupla, empregando dois estágios de desenvolvimento de biofilme, a fim de correlacionar seus efeitos nas fases inicial e madura do biofilme em

comparação com anfotericina B. Demonstrou-se que C7a interferiu com a formação do biofilme dentro de 24 h com um valor de MIC de 1 µg / ml e também teve um efeito significativo nos últimos estádios do biofilme já formado, reduzindo a viabilidade de células de leveduras de *C. albicans* estabelecidas em um biofilme, com um valor de CIM de 1 µg/mL (**Figura 3.3**). Estes resultados indicam que o complexo C7a é eficaz contra as células planctónicas de *C. albicans*, inibindo a formação de biofilmes

C7a induz alterações morfológicas em células de leveduras de *C. albicans*. Utilizando baixas concentrações do composto, observamos danos e / ou ausência da parede celular, danos mitocondriais, alterações do DNA como a marginalização da cromatina dentro do núcleo e aumento significativo dos vacúolos eletroluscentes (**Figura 3.2**). Essas alterações morfológicas são sugestivas de morte celular, embora para uma correta classificação do tipo de morte celular induzida por C7a em *C. albicans*, marcadores específicos devem ser analisados. As imagens de microscopia electrónica sugerem que mecanismos de apoptose e de tipo autofagia estão envolvidos no mecanismo de morte de *P. brasiliensis* pelo composto C7a. Nas leveduras de *P. brasiliensis* tratadas com C7a, observou-se a indução da condensação da cromatina, degradação do DNA, produção de aníons de superóxido e aumento da atividade da metacaspase, sugestiva de apoptose e aumento do número de vacúolos autofágicos e acidificação, sugestivos de autofagia (167). Alterações como inchaço mitocondrial, formação de estruturas anormais da membrana e vacúolos atípicos, também foram observadas na forma tripomastigota de parasitas de *T. cruzi*, quando tratados com C7a (173). Curiosamente, as células tumorais tratadas com o composto C7a apresentaram alterações semelhantes, como a dissipação do potencial da membrana mitocondrial, levando à translocação de Bax, aumento da concentração de cálcio citosólico, diminuição dos níveis de ATP, ativação de caspases efetoras, condensação da cromatina e degradação do DNA (165). As alterações morfológicas observadas em *C. albicans* tratadas com C7a podem ser indicativas do mecanismo de ação deste composto no fungo, aparentemente conservado para todos os organismos e células já testados.

O C7a mostrou-se promissor em modelos experimentais de candidíase sistêmica e vaginal. Foi possível observar que os animais com candidíase sistêmica tratados com

C7a mostraram uma redução estatisticamente significativa das UFC nos rins em relação ao controle. Os animais tratados com FCZ também exibiram o mesmo perfil, porém em uma dose duas vezes maior (**Figura 3.4**). O C7a também foi eficaz no modelo de candidíase sistêmica utilizando animais imunossuprimidos, mostrando uma sobrevivência de 78% em 30 dias de infecção. Já o grupo controle atingiu 100% de mortalidade em 21 dias de infecção (**Figura 3.7**). É de suma importância analisar tratamentos em um modelo que utiliza a imunossupressão, pois a candidíase é uma micose oportunista acometendo pacientes que possuem o sistema imunológico debilitado. Os cremes formulados com C7a também apresentaram proteção no modelo vaginal (**Figura 3.5**). As análises histológicas das vaginas confirmaram a proteção do tratamento com C7a.

C7a tem demonstrado baixa toxicidade *in vivo*. Foi visto que o composto não era tóxico para animais quando 100 µL de uma solução de 150 µg/mL foram administrados sequencialmente durante 5 dias (167). Além disso, foi descrito uma experiência escalonadora de dose, em que os ratos não apresentaram alterações histológicas no fígado, pulmões, rim, coração e baço, após serem inoculados 3 vezes por semana com doses crescentes de C7a, começando em 5 e terminado em 60 M (164).

Devido à sua baixa toxicidade e baixas doses efetivas, o complexo ciclopaladado bifosfínico C7a pode ser uma alternativa ao tratamento de várias espécies de *Candida*, especialmente para o tratamento de células planctônicas ou biofilme de *C. albicans*. Além disso, o C7a pode ser uma alternativa promissora no tratamento da candidíase sistêmica e vaginal, particularmente no controle de *Candida* spp. resistente ao fluconazol.

3.6 Conclusão

- Foi determinado a Concentração mínima inibitória do composto C7a contra 56 isolados de *Candida* spp. A CIM que C7a exibiu foi similar a AMB e mais eficiente que FCZ e MCZ. Também observamos que o composto C7a foi ativo contra isolados de *Candida* spp. resistentes a FCZ.
- C7a foi capaz de inibir o crescimento de biofilmes maduros ou não de *Candida albicans*. Além de inibir o polimorfismo de leveduras para de hifas/pseudo-hifas.
- O tratamento com o composto C7a provocou alterações morfológicas nas leveduras de *Candida albicans* como danos e/ou ausência da parede celular, danos mitocondriais, alterações do DNA como a marginalização da cromatina dentro do núcleo e aumento significativo dos vacúolos eletroluscentes.
- O desempenho do tratamento do composto C7a em dois modelos de experimentais de candidíase foi satisfatório em comparação

REFERENCIAS*

1. Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Sato P, Shikanai-Yasuda MA, et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. Future microbiology [Internet]. 2013;8(9):1177–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24020744>
2. de Oliveira HC, Assato PA, Marcos CM, Scorzoni L, Silva ACA de PE, Da Silva JDF, et al. Paracoccidioides-host interaction: an overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. Frontiers in microbiology. Frontiers Media SA; 2015;6.
3. de Alborno MB. Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from rural soil in Venezuela. Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology. Taylor & Francis; 1971;9(3):248–53.
4. Negroni P. The Paracoccidioides brasiliensis lives saprophytically in the soil of Argentina. Prensa médica argentina. 1966;53(39):2381.
5. Shome SK, Batista AC. Occurrence of Paracoccidioides brasiliensis in the soil of Recife, Brazil. Rev Fac Med Fed Ceará. 1963;3:90–4.
6. Montenegro MR, Miyaji M, Franco M, Nishimura K, Coelho KI, Horie Y, et al. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, state of Sao Paulo, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. SciELO Brasil; 1996;91(6):665–70.
7. Silva-Vergara ML, Martinez R, Chada A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM. Isolation of a Paracoccidioides brasiliensis strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. Medical Mycology. Taylor & Francis; 1998;36(1):37–42.
8. Richini-Pereira VB, De Moraes Gimenes Bosco S, Griesse J, Cordeiro Theodoro R, Assis Da Graça Macoris S, José Da Silva R, et al. Molecular detection of Paracoccidioides brasiliensis in road-killed wild animals. Medical mycology. Taylor & Francis; 2008;46(1):35–40.
9. Aristizabal BH, Clemons K V, Cock AM, Restrepo A, Stevens DA. Experimental Paracoccidioides brasiliensis infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. Medical mycology. Taylor & Francis; 2002;40(2):169–78.
10. Shankar J, Restrepo A, Clemons K V, Stevens DA. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. Clinical microbiology reviews. Am Soc Microbiol; 2011;24(2):296–313.
11. Pinzan CF, Ruas LP, Casabona-Fortunato AS, Carvalho FC, Roque-Barreira M-C. Immunological basis for the gender differences in murine Paracoccidioides brasiliensis infection. PLoS One. Public Library of Science; 2010;5(5):e10757.
12. Marques SA, Lastória JC, Marques MEA. Paracoccidioidomycosis in a patient with cervical cancer. Anais brasileiros de dermatologia. SciELO Brasil; 2011;86(3):587–8.

*De acordo:

International Committee of Medical Journal Editors. [internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.gov/bsd/uniform_requirements.html

13. Shikanai-Yasuda MA, Duarte MIS, Nunes DF, Lacaz CS, Sabagga E, Abdala E, et al. Paracoccidioidomycosis in a renal transplant recipient. *Journal of medical and veterinary mycology*. Oxford University Press; 1995;33(6):411–4.
14. Sugar AM, Restrepo A, Stevens DA. Paracoccidioidomycosis in the immunosuppressed host: report of a case and review of the literature. *The American review of respiratory disease*. 1984;129(2):340–2.
15. Woyciechowsky TG, Dalcin DC, dos Santos JWA, Michel GT. Paracoccidioidomycosis induced by immunosuppressive drugs in a patient with rheumatoid arthritis and bone sarcoma: case report and review of the literature. *Mycopathologia*. Springer; 2011;172(1):77–81.
16. Martinez R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. *Journal of Fungi*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2017;3(1):1.
17. Prado M, da Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: A review from 1996 to 2006. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104(3):513–21.
18. Martinez R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. SciELO Brasil; 2010;43(4):480.
19. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. Springer; 2008;165(4–5):209–21.
20. Carvalho KC, Vallejo MC, Camargo ZP, Puccia R. Use of recombinant gp43 isoforms expressed in *Pichia pastoris* for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. Am Soc Microbiol; 2008;15(4):622–9.
21. Albuquerque CF, da Silva SHM, Camargo ZP. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol; 2005;43(4):1944–6.
22. Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycosis treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. SciELO Brasil; 2015;57:31–7.
23. Benard G, Campos AF, Netto LC, Gonçalves LG, Machado LR, Mimicos E V, et al. Treatment of severe forms of paracoccidioidomycosis: is there a role for corticosteroids? *Medical mycology*. Oxford University Press; 2012;50(6):641–8.
24. Rodríguez-Brito S, Niño-Vega G, San-Blas G. Caspofungin affects growth of *Paracoccidioides brasiliensis* in both morphological phases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol; 2010;54(12):5391–4.
25. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular biology and evolution* [Internet]. 2006;23(1):65–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151188>
26. Theodoro RC, de Melo Teixeira M, Felipe MSS, dos Santos Paduan K, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Genus *Paracoccidioides*: species recognition and biogeographic aspects. *PloS one*. Public

Library of Science; 2012;7(5):e37694.

27. Salgado-Salazar C, Jones LR, Restrepo A, McEwen JG. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. *Cladistics*. Wiley Online Library; 2010;26(6):613–24.
28. Carrero LL, Nino-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJA, Soares CMA, Pereira M, et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genetics and Biology*. Elsevier; 2008;45(5):605–12.
29. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ a, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular phylogenetics and evolution* [Internet]. 2009;52(2):273–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376249>
30. Pagliari C, Sotto MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. *The American journal of dermatopathology*. LWW; 2003;25(2):107–12.
31. Sadahiro A, Diogo CL, Oshiro TM, Shikanai-Yasuda MA. Kinetics of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43 peptides, in patients cured of paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. SciELO Brasil; 2007;40(2):156–62.
32. Corvino CL, Mamoni RL, Fagundes GZZ, Blotta M. Serum interleukin-18 and soluble tumour necrosis factor receptor 2 are associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis. *Clinical & Experimental Immunology*. Wiley Online Library; 2007;147(3):483–90.
33. Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infection and Immunity*. Am Soc Microbiol; 1998;66(2):800–6.
34. Pagliari C, Pereira NV, Kanashiro L, Stegun FW, Croda J, Duarte MIS, et al. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. *Journal of cutaneous pathology*. Wiley Online Library; 2010;37(5):565–70.
35. Peraçoli MTS, Fortes MRP, Pereira da Silva MF, Montenegro MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. SciELO Brasil; 1995;37(2):129–36.
36. Pina A, Bernardino S, Calich VLG. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Journal of leukocyte biology*. Soc Leukocyte Biology; 2008;83(5):1088–99.
37. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *science*. American Association for the Advancement of Science; 2004;303(5663):1532–5.

38. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press; 2007;176(2):231–41.
39. Medina E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *Journal of innate immunity*. Karger Publishers; 2009;1(3):176–80.
40. Della Coletta AM, Bachiega TF, e Silva JC de Q, de Campos Soares ÂMV, De Faveri J, Marques SA, et al. Neutrophil extracellular traps identification in tegumentary lesions of patients with paracoccidioidomycosis and different patterns of NETs generation in vitro. *PLoS Negl Trop Dis*. Public Library of Science; 2015;9(9):e0004037.
41. Mejía SP, Cano LE, Lopez JA, Hernandez O, Gonzalez A. Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology*. Microbiology Society; 2015;161(5):1008–17.
42. Nakaira-Takahagi E, Golim MA, Bannwart CF, Puccia R, Peraçoli MTS. Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. *Medical mycology*. Taylor & Francis; 2011;49(7):694–703.
43. Gonzalez A, de Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric Oxide Participation in the Fungicidal Mechanism of Gamma Interferon-Activated Murine Macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia. *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol; 2000;68(5):2546–52.
44. Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, Furlanetto AB, Campanelli AP, Cunha FQ, 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*. Am Assoc Immunol; 1998;161(6):3056–63.
45. Nascimento FRF, Calich VLG, Rodríguez D, Russo M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *The Journal of Immunology*. Am Assoc Immunol; 2002;168(9):4593–600.
46. Dos Santos SS, Ferreira KS, Almeida SR. *Paracoccidioides brasiliensis*-induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes. *PloS one*. Public Library of Science; 2011;6(5):e19690.
47. Ferreira MC, de Oliveira RTD, da Silva RM, Blotta MHSL, Mamoni RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol; 2010;78(10):4392–401.
48. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *The Journal of experimental medicine*. Rockefeller Univ Press; 2009;206(2):299–311.
49. Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine*. Elsevier; 2008;43(3):402–7.
50. Cano LE, Singer-Vermes LM, Costa TA, Mengel JO, Xidieh CF, Arruda C, et al. Depletion of CD8+ T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary

- paracoccidioidomycosis. Infection and immunity. Am Soc Microbiol; 2000;68(1):352–9.
51. Barnett JA. A history of research on yeasts 14: 1 medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. Yeast. Wiley Online Library; 2010;27(11):875–904.
 52. O'Meara TR, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. Clinical microbiology reviews. Am Soc Microbiol; 2012;25(3):387–408.
 53. Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castanon-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole. Antimicrobial agents and chemotherapy. Am Soc Microbiol; 2012;AAC-01115.
 54. Nielsen K, De Obaldia AL, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. Eukaryotic cell. Am Soc Microbiol; 2007;6(6):949–59.
 55. May RC, Stone NRH, Wiesner DL, Bicanic T, Nielsen K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. Nature Reviews Microbiology. Nature Publishing Group; 2016;14(2):106–17.
 56. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Annu Rev Microbiol. Annual Reviews; 2006;60:69–105.
 57. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. Aids. LWW; 2009;23(4):525–30.
 58. Giles SS, Dagenais TRT, Botts MR, Keller NP, Hull CM. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Infection and immunity. Am Soc Microbiol; 2009;77(8):3491–500.
 59. Liu T-B, Perlin DS, Xue C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. Virulence. Taylor & Francis; 2012;3(2):173–81.
 60. Del Poeta M, Casadevall A. Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. Mycopathologia. Springer; 2012;173(5–6):303–10.
 61. Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, Dam T, et al. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. Infection and immunity. Am Soc Microbiol; 2004;72(9):4985–95.
 62. Chen SHM, Stins MF, Huang S-H, Chen YH, Kwon-Chung KJ, Chang Y, et al. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. Journal of medical microbiology. Microbiology Society; 2003;52(11):961–70.
 63. Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. Infection and immunity. Am Soc Microbiol; 2009;77(1):120–7.
 64. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice

- guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*. Oxford University Press; 2010;50(3):291–322.
65. Tseng H-K, Huang T-Y, Wu AY-J, Chen H-H, Liu C-P, Jong A. How *Cryptococcus* interacts with the blood–brain barrier. *Future microbiology*. *Future Medicine*; 2015;10(10):1669–82.
 66. Zaragoza O, Nielsen K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Current opinion in microbiology*. Elsevier; 2013;16(4):409–13.
 67. Stukes S, Casadevall A. Visualizing non-lytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages using digital light microscopy. *Journal of visualized experiments: JoVE*. MyJoVE Corporation; 2014;(92).
 68. Zhou Q, Murphy WJ. Immune response and immunotherapy to *Cryptococcus* infections. *Immunologic research*. Springer; 2006;35(3):191–207.
 69. Antachopoulos C, Walsh TJ. Immunotherapy of *Cryptococcus* infections. *Clinical Microbiology and Infection*. Wiley Online Library; 2012;18(2):126–33.
 70. Dromer F, Salameró J, Contrepois A, Carbon C, Yeni P. Production, characterization, and antibody specificity of a mouse monoclonal antibody reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Infection and immunity*. *Am Soc Microbiol*; 1987;55(3):742–8.
 71. Eckert TF, Kozel TR. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Infection and immunity*. *Am Soc Microbiol*; 1987;55(8):1895–9.
 72. Casadevall A, Mukherjee J, Devi SJN, Schneerson R, Robbins JB, Scharff MD. Antibodies elicited by a *Cryptococcus neoformans*-tetanus toxoid conjugate vaccine have the same specificity as those elicited in infection. *Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press; 1992;165(6):1086–93.
 73. Fleuridor R, Zhong Z, Pirofski L. A human IgM monoclonal antibody prolongs survival of mice with lethal cryptococcosis. *Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press; 1998;178(4):1213–6.
 74. Casadevall A, Cleare W, Feldmesser M, Glatman-Freedman A, Goldman DL, Kozel TR, et al. Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. *Am Soc Microbiol*; 1998;42(6):1437–46.
 75. Casadevall A, Pirofski L. Antibody-mediated protection through cross-reactivity introduces a fungal heresy into immunological dogma. *Infection and immunity*. *Am Soc Microbiol*; 2007;75(11):5074–8.
 76. Cassone A, Casadevall A. Recent progress in vaccines against fungal diseases. *Current opinion in microbiology*. Elsevier; 2012;15(4):427–33.
 77. Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, Franco M, Travassos LR. Mapping of the T-Cell Epitope in the Major 43-Kilodalton Glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* Which Induces a Th-1 Response Protective against Fungal Infection in BALB/c Mice. *Infection and immunity*. *Am Soc Microbiol*; 1998;66(2):786–93.

78. Iwai LK, Yoshida M, Sidney J, Shikanai-Yasuda MA, Goldberg AC, Juliano MA, et al. In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* frequently recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized ind. *Molecular Medicine*. Cambridge, MA: Blackwell Science, Inc., 1994-; 2003;9(9–12):209–19.
79. Marques AF, Da Silva MB, Juliano MAP, Travassos LR, Taborda CP. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol; 2006;50(8):2814–9.
80. Marques AF, da Silva MB, Juliano MAP, Munhoz JE, Travassos LR, Taborda CP. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infection*. Elsevier; 2008;10(12):1251–8.
81. Braga CJM, Rittner GMG, Henao JEM, Teixeira AF, Massis LM, Sbrogio-Almeida ME, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FliC flagellin. *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol; 2009;77(4):1700–7.
82. Amaral AC, Marques AF, Muñoz JE, Bocca AL, Simioni AR, Tedesco AC, et al. Poly (lactic acid-glycolic acid) nanoparticles markedly improve immunological protection provided by peptide P10 against murine paracoccidioidomycosis. *British journal of pharmacology*. Wiley Online Library; 2010;159(5):1126–32.
83. Mayorga O, Muñoz J, Lincopan N, Teixeira A, Ferreira LC, Travassos L, et al. The role of adjuvants in therapeutic protection against paracoccidioidomycosis after immunization with the P10 peptide. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2012;3:154. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00154>
84. Magalhães A, Ferreira KS, Almeida SR, Nosanchuk JD, Travassos LR, Taborda CP. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clinical and Vaccine Immunology*. Am Soc Microbiol; 2012;19(1):23–9.
85. Taborda CP, Camargo ZP. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol; 1994;32(2):554–6.
86. Taborda CP, Camargo ZP. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen-gp43. *Journal of medical and veterinary mycology*. Taylor & Francis; 1993;31(2):155–60.
87. Puccia R, Schenkman S, Gorin PA, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infection and Immunity*. Am Soc Microbiol; 1986;53(1):199–206.
88. Giannini MJ, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Stolf AM, Masuda A, Amato N V, et al. Antibody

- response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1990;43(2):200–6.
89. Camargo ZP, Gesztesi JL, Saraiva EC, Taborda CP, Vicentini AP, Lopes JD. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol; 1994;32(10):2377–81.
 90. Goldani LZ, Picard M, Sugar AM. Synthesis of heat-shock proteins in mycelia and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of medical microbiology*. Microbiology Society; 1994;40(2):124–8.
 91. Almeida IC, Neville DCA, Mehlert A, Treumann A, Ferguson AJ, Previato JO, et al. Structure of the N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glycobiology*. Soc Glycobiology; 1996;6(5):507–15.
 92. Vicentini AP, Gesztesi J-L, Franco MF, de Souza W, De Moraes JZ, Travassos LR, et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infection and Immunity*. Am Soc Microbiol; 1994;62(4):1465–9.
 93. Popi AF, Lopes JD, Mariano M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cellular immunology*. Elsevier; 2002;218(1):87–94.
 94. Almeida SR, Unterkircher CS, Camargo ZP. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. *Medical mycology*. Oxford University Press; 1998;36(6):405–11.
 95. Saraiva ECO, Altemani A, Franco MF, Unterkircher CS, Camargo ZP. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin. *Journal of medical and veterinary mycology*. Taylor & Francis; 1996;34(3):155–61.
 96. de Mattos Grosso D, de Almeida SR, Mariano M, Lopes JD. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol; 2003;71(11):6534–42.
 97. do Nascimento Martins EM, Reis BS, de Resende MA, de Andrade ASR, Goes AM. Mice immunization with radioattenuated yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*: influence of the number of immunizations. *Mycopathologia*. Springer; 2009;168(2):51–8.
 98. Alegre ACP, Oliveira AF, Almeida FBDR, Roque-Barreira MC, Hanna ES. Recombinant paracoccin reproduces the biological properties of the native protein and induces protective Th1 immunity against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. Public Library of Science; 2014;8(4):e2788.
 99. Fernandes VC, Coitinho JB, Veloso JMR, Araújo S de A, Pedroso EP, Goes AM de. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Journal of immunological*

- methods. Elsevier; 2011;367(1):78–84.
100. Fernandes VC, Martins EMN, Boeloni JN, Coitinho JB, Serakides R, Goes AM. Additive effect of rPb27 immunization and chemotherapy in experimental paracoccidioidomycosis. PLoS one. Public Library of Science; 2011;6(3):e17885.
 101. Casadevall A, Feldmesser M, Pirofski L. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. Current opinion in microbiology. Elsevier; 2002;5(4):386–91.
 102. Deepe GS. Prospects for the development of fungal vaccines. Clinical microbiology reviews. Am Soc Microbiol; 1997;10(4):585–96.
 103. Maitta RW, Datta K, Lees A, Belouski SS, Pirofski L. Immunogenicity and efficacy of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan peptide mimotope-protein conjugates in human immunoglobulin transgenic mice. Infection and immunity. Am Soc Microbiol; 2004;72(1):196–208.
 104. Travassos LR, Rodrigues EG, Iwai LK, Taborda CP. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. Mycopathologia. Springer; 2008;165(4–5):341–52.
 105. Leitão Jr NP, Vallejo MC, Conceição PM, Camargo ZP, Hahn R, Puccia R. Paracoccidioides lutzii Plp43 is an active glucanase with partial antigenic identity with *P. brasiliensis* gp43. PLOS Negl Trop Dis. Public Library of Science; 2014;8(8):e3111.
 106. Muñoz JE, Luft VD, Amorim J, Magalhães A, Thomaz L, Nosanchuk JD, et al. Immunization with P10 peptide increases specific immunity and protects immunosuppressed BALB/c mice infected with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycopathologia. Springer; 2014;178(3–4):177–88.
 107. Gonçalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. Current protocols in immunology. Wiley Online Library; 2008;11–4.
 108. Bozzacco L, Yu H. Identification and quantitation of MHC class II-bound peptides from mouse spleen dendritic cells by immunoprecipitation and mass spectrometry analysis. Immunoproteomics: Methods and Protocols. Springer; 2013;231–43.
 109. Bozzacco L, Yu H, Zebroski HA, Deng H, Mojsos S, Steinman RM. Mass Spectrometry Analysis and Quantitation of Peptides Presented on the MHC II Molecules of Mouse Spleen Dendritic Cells. 2011;5016–30.
 110. Longo LVG, Nakayasu ES, Gazos-Lopes F, Vallejo MC, Matsuo AL, Almeida IC, et al. Characterization of cell wall lipids from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis* cultivated in the presence or absence of human plasma. PLoS one. Public Library of Science; 2013;8(5):e63372.
 111. Restrepo A, Cano LE, Ochoa MT. A yeast-derived antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* useful for serologic testing. Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology. Taylor & Francis; 1985;23(1):23–9.
 112. Burk RF. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. The FASEB journal.

- FASEB; 1991;5(9):2274–9.
113. Wang H, Kazanietz MG. Chimaerins, Novel Non-protein Kinase C Phorbol Ester Receptors, Associate with Tmp21-I (p23) EVIDENCE FOR A NOVEL ANCHORING MECHANISM INVOLVING THE CHIMAERIN C1 DOMAIN. *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB; 2002;277(6):4541–50.
 114. Collins HL, Bancroft GJ. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* impairs antigen-specific T-cell responses. *Infection and immunity*. *Am Soc Microbiol*; 1991;59(11):3883–8.
 115. Vecchiarelli A, Pietrella D, Dottorini M, Monari C, Retini C, Todisco T, et al. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* regulates fungicidal activity and the antigen presentation process in human alveolar macrophages. *Clinical & Experimental Immunology*. Wiley Online Library; 1994;98(2):217–23.
 116. Vecchiarelli A, Retini C, Monari C, Tascini C, Bistoni F, Kozel TR. Purified capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. *Infection and immunity*. *Am Soc Microbiol*; 1996;64(7):2846–9.
 117. Ralph P, Prichard J, Cohn M. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. *The Journal of Immunology*. *Am Assoc Immunol*; 1975;114(2 Part 2):898–905.
 118. Th AN, Epitope C, Bär E, Gladiator A, Bastidas S, Roschitzki B, et al. A Novel Th Cell Epitope of. 2016;
 119. Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 2002;20(1):621–67.
 120. Taborda CP, Casadevall A. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Immunity*. Elsevier; 2002;16(6):791–802.
 121. Wang C, Yu X, Cao Q, Wang Y, Zheng G, Tan TK, et al. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC immunology*. BioMed Central; 2013;14(1):1.
 122. Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*. Nature Research; 2015;15(4):203–16.
 123. Soto J, Soto P. Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy* [Internet]. 2006;4(2):177–85. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/14787210.4.2.177>
 124. Luna-Marín KP, Hernández IP, Rueda CM, Zorro MM, Croft SL, Escobar P. In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. *Biomédica, Revista del Instituto Nacional de Salud* [Internet]. 2009;29(3):448–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436996>
 125. Croft SL, Barrett MP, Urbina J a. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 2005;21(11):508–12.
 126. Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and

- therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2012;67(11):2576–97. Available from: <http://www.jac.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dks275>
127. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*. Mass Medical Soc; 2002;347(22):1739–46.
 128. Brilhante RSN, Caetano EP, Lima RAC, Castelo Branco DSCM, Serpa R, Oliveira JS, et al. *In vitro* antifungal activity of miltefosine and levamisole: their impact on ergosterol biosynthesis and cell permeability of dimorphic fungi. *Journal of Applied Microbiology* [Internet]. 2015;119(4):962–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12891>
 129. Brilhante RSN, Malaquias ADM, Caetano EP, Castelo-Branco DDSCM, Lima RAC De, Marques FJDF, et al. In vitro inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp. *Medical mycology* [Internet]. 2014;52(3):320–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662247>
 130. Borba-Santos LP, Rodrigues AM, Gagini TB, Fernandes GF, Castro R, de Camargo ZP, et al. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. *Medical mycology* [Internet]. 2015;53(2):178–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25394542>
 131. Vila TVM, Quintanilha NS, Rozental S. Miltefosine is effective against *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* nail biofilms in vitro. *Journal of Medical Microbiology*. Microbiology Society; 2015;
 132. Imbert S, Palous M, Meyer I, Dannaoui E, Mazier D, Datry A, et al. In Vitro Combination of Voriconazole and Miltefosine against Clinically Relevant Molds. *Antimicrobial agents and chemotherapy* [Internet]. 2014;58(11):6996–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25199776>
 133. Tong Z, Widmer F, Sorrell TC, Guse Z, Jolliffe K a., Halliday C, et al. In vitro activities of miltefosine and two novel antifungal biscationic salts against a panel of 77 dermatophytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51(6):2219–22.
 134. Compain F, Botterel F, Sitterle E, Paugam a., Bougnoux M-E, Dannaoui E. In vitro activity of miltefosine in combination with voriconazole or amphotericin B against clinical isolates of *Scedosporium* spp. *Journal of Medical Microbiology* [Internet]. 2015;64(Pt_3):309–11. Available from: <http://jmm.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/jmm.0.000019>
 135. Widmer F, Wright LC, Obando D, Handke R, Ganendren R, Ellis DH, et al. Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(2):414–21.
 136. Vila TVM, Chaturvedi AK, Rozental S, Lopez-Ribot JL. Characterization of the *in vitro* activity of Miltefosine against *Candida albicans* under planktonic and biofilm growing conditions and *in vivo* efficacy in the murine model of oral candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet].

- 2015;(September):AAC.01890-15. Available from:
<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01890-15>
137. Vila TVM, Ishida K, de Souza W, Prousis K, Calogeropoulou T, Rozental S. Effect of alkylphospholipids on *Candida albicans* biofilm formation and maturation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(1):113–25.
 138. Sindermann H, Engel J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Oxford University Press; 2006;100(Supplement 1):S17–20.
 139. Berman J. Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert opinion on pharmacotherapy*. Taylor & Francis; 2005;6(8):1381–8.
 140. Bhattacharya SK, Sinha PK, Sundar S, Thakur CP, Jha TK, Pandey K, et al. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press; 2007;196(4):591–8.
 141. Cruz RC, Werneck SMC, Oliveira CS, Santos PC, Soares BM, Santos D a, et al. Influence of different media, incubation times, and temperatures for determining the MICs of seven antifungal agents against *Paracoccidioides brasiliensis* by microdilution. *Journal of clinical microbiology* [Internet]. 2013;51(2):436–43. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3553879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 142. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations. *Antibiotics in laboratory medicine*. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia, PA; 2005;5:365–440.
 143. de Amorim J, Magalhães A, Muñoz JE, Rittner GMG, Nosanchuk JD, Travassos LR, et al. DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis induces long-term protection in presence of regulatory T cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* [Internet]. 2013;15(3):181–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23201596>
 144. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller M a. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for standardized methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42(5):1207–12.
 145. Rosas ÁL, Nosanchuk JD, Feldmesser M, Cox GM, McDade HC, Casadevall A. Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol; 2000;68(5):2845–53.
 146. Biswas C, Sorrell TC, Djordjevic JT, Zuo X, Jolliffe KA, Chen SCA. In vitro activity of miltefosine as a single agent and in combination with voriconazole or posaconazole against uncommon filamentous fungal pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(July):2842–6.
 147. Ishida K, Rodrigues JCF, Ribeiro MD, Vila TVM, de Souza W, Urbina JA, et al. Growth inhibition and ultrastructural alterations induced by $\Delta 24$ (25)-sterol methyltransferase inhibitors in *Candida* spp. isolates, including non-*albicans* organisms. *BMC microbiology*. BioMed Central Ltd; 2009;9(1):74.

148. Ishida K, Rodrigues JCF, Cammerer S, Urbina JA, Gilbert I, Souza W, et al. Synthetic arylquinuclidine derivatives exhibit antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilopsis*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. BioMed Central; 2011;10(1):1.
149. Zuo X, Djordjevic JT, Bijosono Oei J, Desmarini D, Schibeci SD, Jolliffe K a, et al. Miltefosine induces apoptosis-like cell death in yeast via Cox9p in cytochrome c oxidase. *Molecular pharmacology* [Internet]. 2011;80(3):476–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21610197>
150. Moreira RA, Mendanha SA, Hansen D, Alonso A. Interaction of miltefosine with the lipid and protein components of the erythrocyte membrane. *Journal of pharmaceutical sciences*. Wiley Online Library; 2013;102(5):1661–9.
151. Franzen AJ, Cunha MML, Miranda K, Hentschel J, Plattner H, da Silva MB, et al. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *Journal of structural biology* [Internet]. 2008;162(1):75–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096404>
152. Eisenman HC, Frases S, Nicola AM, Rodrigues ML, Casadevall A. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. Microbiology Society; 2009;155(12):3860–7.
153. Upadhyay S, Xu X, Lowry D, Jackson JC, Roberson RW, Lin X. Subcellular Compartmentalization and Trafficking of the Biosynthetic Machinery for Fungal Melanin. *Cell reports*. Elsevier; 2016;14(11):2511–8.
154. Gómez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. *Current opinion in infectious diseases*. LWW; 2003;16(2):91–6.
155. Gessler NN, Egorova AS, Belozerskaya TA. Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review). *Applied biochemistry and microbiology*. Springer; 2014;50(2):105–13.
156. Urán ME, Nosanchuk JD, Restrepo A, Hamilton AJ, Gómez BL, Cano LE. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* melanin in in vitro and in vivo studies during infection. *Clinical and vaccine immunology: CVI* [Internet]. 2011;18(10):1680–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3187017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
157. Taborda CP, Da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia*. Springer; 2008;165(4–5):331–9.
158. Campion EW, Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2015;373(15):1445–56. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1315399>
159. da Silva Dantas A, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, et al. Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier; 2016;34:111–8.

160. Lacaz C da S, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Takahashi de Melo N. Tratado de micologia médica. SciELO Brasil; 2002.
161. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in microbiology. Elsevier; 2001;9(7):327–35.
162. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. PLoS One. Public Library of Science; 2014;9(7):e101510.
163. Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. Medical Mycology. Taylor & Francis; 2007;45(4):321–46.
164. Dovnik A, Golle A, Novak D, Arko D, Takač I. Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica. 2014;24(1):5–7.
165. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases. Oxford University Press; 2015;civ933.
166. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. Clinical microbiology reviews. Am Soc Microbiol; 1999;12(1):40–79.
167. Kurtz MB, Douglas CM. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. Journal of Medical and Veterinary Mycology. Oxford University Press; 1997;35(2):79–86.
168. Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. Drug Resistance Updates. Elsevier; 2007;10(3):121–30.
169. Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. Antimicrobial agents and chemotherapy. American Society for Microbiology (ASM); 1990;34(2):183.
170. Espinel-Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. Revista iberoamericana de micología. Asociación Española de Micología; 2008;25(2):101–6.
171. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clinical Infectious Diseases. Oxford University Press; 2008;46(1):120–8.
172. Caires ACF. Recent advances involving palladium (II) complexes for the cancer therapy. Anti-cancer agents in medicinal chemistry [Internet]. 2007;7(5):484–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17896909>
173. Rodrigues EG, Silva LS, Fausto DM, Hayashi MS, Dreher S, Santos EL, et al. Cyclopalladated compounds as chemotherapeutic agents: antitumor activity against a murine melanoma cell line. International journal of cancer. Wiley Online Library; 2003;107(3):498–504.
174. Serrano F a, Matsuo AL, Monteforte PT, Bechara A, Smaili SS, Santana DP, et al. A cyclopalladated complex interacts with mitochondrial membrane thiol-groups and induces the apoptotic intrinsic pathway in murine and cisplatin-resistant human tumor cells. BMC cancer [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;11(1):296. Available from:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/296>

175. Guimaraes-Correa AB, Crawford LB, Figueiredo CR, Gimenes KP, Pinto LA, Grassi MFR, et al. C7a, a biphosphinic cyclopalladated compound, efficiently controls the development of a patient-derived xenograft model of adult T cell leukemia/lymphoma. *Viruses. Molecular Diversity Preservation International*; 2011;3(7):1041–58.
176. Matsuo AL, Silva LS, Torrecilhas AC, Pascoalino BS, Ramos TC, Rodrigues EG, et al. In vitro and in vivo trypanocidal effects of the cyclopalladated compound 7a, a drug candidate for treatment of Chagas' disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2016 Mar 7];54(8):3318–25. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/content/long/54/8/3318>
177. Arruda DC, Matsuo AL, Silva LS, Real F, Leitão NP, Pires JHS, et al. Cyclopalladated compound 7a induces apoptosis-and autophagy-like mechanisms in *Paracoccidioides* and is a candidate for paracoccidioidomycosis treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy. Am Soc Microbiol*; 2015;59(12):7214–23.
178. Rossi DC, Muñoz JE, Carvalho DD, Belmonte R, Faintuch B, Borelli P, et al. Therapeutic use of a cationic antimicrobial peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* in the control of experimental candidiasis. *BMC microbiology. BioMed Central*; 2012;12(1):1.
179. Wayne P. Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. CLSI document M27-A3 and Supplement S. 3.
180. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Mowat E, Ramage G, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols. Nature Publishing Group*; 2008;3(9):1494–500.
181. Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Prince RA, Marchillo K, Ashbeck J, et al. In vivo pharmacodynamic characterization of anidulafungin in a neutropenic murine candidiasis model. *Antimicrobial agents and chemotherapy. Am Soc Microbiol*; 2008;52(2):539–50.
182. Hamad M, Abu-Elteen KH, Ghaleb M. Estrogen-dependent induction of persistent vaginal candidosis in naïve mice. *Mycoses. Wiley Online Library*; 2004;47(7):304–9.
183. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4: 119–128. 2013.
184. Gil C, Pomes R, Nombela C. Isolation and characterization of *Candida albicans* morphological mutants derepressed for the formation of filamentous hypha-type structures. *Journal of bacteriology. Am Soc Microbiol*; 1990;172(5):2384–91.
185. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infection and immunity. Am Soc Microbiol*; 2003;71(8):4333–40.
186. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annual review of microbiology. Annual Reviews*; 2015;69:71–92.