SAMUEL RODRIGUES DOS SANTOS JÚNIOR

Peptídeo P10 complexado em nanopartículas poliméricas como vacina terapêutica intranasal para o tratamento da paracoccidioidomicose em modelo murino.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2018

SAMUEL RODRIGUES DOS SANTOS JÚNIOR

Peptídeo P10 complexado em nanopartículas poliméricas como vacina terapêutica intranasal para o tratamento da paracoccidioidomicose em modelo murino.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

Coorientador: Prof. Dr. André Corrêa Amaral

Versão Previa

São Paulo
2018

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)

Rodrigues Dos Santos Júnior, Samuel
Peptídeo P10 complexado em nanopartículas poliméricas como vacina terapêutica intranasal para o tratamento da paracoccidioidomicose em modelo murino. / Samuel Rodrigues Dos Santos Júnior; orientador Carlos Pelleschi Taborda; coorientador André Corrêa Amaral. -- São Paulo, 2018.
68 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Peptídeo P10. 3. Vacina . 4. Nanopartículas de quitosana. I. Pelleschi Taborda, Carlos , orientador. II. Corrêa Amaral, André, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Samuel Rodrigues Dos Santos Júnior

Título da Dissertação/Tese: Peptídeo P10 complexado em nanopartículas poliméricas como vacina terapêutica intranasal para o tratamento da paracoccidioidomicose em modelo murino.

Orientador: Carlos Pelleschi Taborda

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o (a) candidato (a):

( ) Aprovado (a) ( ) Reprovado (a)

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***PEPTÍDEO P10 COMPLEXADO EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO VACINA TERAPÊUTICA INTRANASAL PARA O TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM MODELO MURINO***", registrado sob o protocolo nº ***65/2016***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***11/10/2016*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Carlos Pelleschi Taborda***
- Departamento: *Microbiologia*
- Membros da Equipe: *Samuel Rodrigues Dos Santos Júnior (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico *www.icb.usp.br/ceua*. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***P10 PEPTIDE COMPLEXED IN POLYMERIC NANOPARTICLES AS THERAPEUTIC INTRANASAL VACCINE FOR PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS TREATMENT IN MURINE MODEL***", protocol nº ***65/2016***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***10/11/2016*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Carlos Pelleschi Taborda***
- Team members: *Samuel Rodrigues Dos Santos Júnior (Graduate Student).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*Balb-C*	*Macho/Male*	*6-8 semanas/weeks*	*357*

São Paulo, 14 de outubro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo - SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091 7733 - e mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.019.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **065/2016/CEUA**, de 11/10/2016, aprovo a inclusão dos animais abaixo indicados ao Protocolo "***PEPTÍDEO P10 COMPLEXADO EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO VACINA TERAPÊUTICA INTRANASAL PARA O TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM MODELO MURINO***", de responsabilidade do Prof. Dr. **Carlos Pelleschi Taborda**, do Departamento de Microbiologia, devido a contaminação dos meios de cultura pós-inoculação dos macerados de órgãos, necessitando a repetição dos experimentos e por apresentar falta de homogeneidade entre os animais infectados, mesmo com o estabelecimento do modelo:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Camundongo	Balb-c	Machos	6-8 semanas	174

São Paulo, 07 de março de 2018.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

À minha família e amigos pelo apoio e incentivo em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda, pela oportunidade de ter realizado este trabalho, pela confiança em deixar uma pesquisa de tamanha relevância em minhas mãos, pelos ensinamentos e aprendizados que obtive ao longo destes dois anos, principalmente na área da microbiologia com ênfase em micologia e por estar presente para dar conselhos, achar soluções e alternativas para diversos problemas.

Agradeço ao Prof. Dr. André Corrêa Amaral, por ser meu coorientador e por ter aceitado e embarcado na parceria de desenvolver uma vacina com bases nanotecnológicas para o tratamento da paracoccidioidomicose. E, por estar presente nos diversos momentos de dificuldade auxiliando no meu crescimento.

Agradeço os colegas de Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos (LFDP) pelos auxílios, amizades e companheirismo. Em especial o Msc. Marcelo Araújo por ter me auxiliado em todas as eutanásias e em alguns outros experimentos, sem os quais a conclusão do meu projeto não seria possível. Agradeço também ao Msc. Leandro Buffoni, por ter realizado as infecções dos animais.

Agradeço a Dra. Ana Camila Oliveira Souza, ex-companheira de LFDP, mas para sempre amiga e inspiração, por ter me recebido e ensinado praticamente tudo o que hoje sei sobre o cultivo e cuidado da levedura *Paracoccidioides brasiliensis*, cultura de células entre outros experimentos, sem os quais a conclusão do meu projeto não seria possível.

Agradeço ao Dr. Lucas dos Santos Dias, ex-companheiro de LFDP, mas para sempre amigo e inspiração, por ter me ensinado praticamente tudo o que hoje sei sobre ensaios imuno enzimáticos e análises de dados de diversos ensaios e experimentos, sem os quais a conclusão do meu projeto não seria possível.

Agradeço a técnica do Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos, Zita Maria de Oliveira Gregório, pela disposição, paciência e amizade que demonstrou por mim desde a primeira vez que vim ao laboratório.

Agradeço a Msc. Cristina Spadari, ao Rafael Andriole ao Msc. Marcelo Araújo, ao Msc. Artur Ribeiro e a Aline Luiza, pelas amizades, churrascos e "*rolês*" em São Paulo.

Agradeço os colegas de Laboratório de Nano & Biotecnologia (LANAB) pelos auxílios, amizades e companheirismo. Agradeço em especial à futura mestra Francenya K. Lopes da Silva pela sua amizade e por ter confeccionado e me enviado as nanopartículas de quitosana, sem as quais a conclusão do meu projeto não seria possível.

Agradeço a minha família pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTO AS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro na modalidade: Bolsa Mestrado – GM, processo: 134424/2016-6. Agradeço também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro na categoria de Projeto Temático, processo: 2016/08730-6.

RESUMO

SANTOS JUNIOR, SRS**. Peptídeo P10 complexado em nanopartículas poliméricas como vacina terapêutica intranasal para o tratamento da paracoccidioidomicose em modelo murino.** 2018. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia) – Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença que atinge primariamente os pulmões, podendo também ocorrer de forma sistêmica e, é causada pelo fungo termo dimórfico *Paracoccidioides* spp. Os principais medicamentos para o tratamento da PCM são quimioterápicos poliênicos, compostos sulfanilamídicos e os azóis. Uma possível ferramenta para tratar e/ ou prevenir a PCM é o uso de vacinas para a geração de resposta imune principalmente do tipo Th_1, produtora de IFN-gama, citocina com papel importante para o controle da doença. Um dos candidatos vacinais mais estudados para a PCM, é a vacina com base no peptídeo P10, formado por 15 resíduos de aminoácidos (aa), derivado da glicoproteína de 43 kDa de *P. brasiliensis.* Com o objetivo de se aprimorar o efeito imunomodulador do peptídeo P10, foi proposto neste trabalho a sua complexação com nanopartículas poliméricas de quitosana. A quitosana foi escolhida em função das suas características físico-químicas e biológicas tais como biocompatibilidade e mucoadesividade, características essenciais para o trabalho em questão. As nanopartículas de quitosana complexadas com o peptídeo P10 em diferentes concentrações foram produzidas a partir da técnica de gelificação iônica e, posteriormente caracterizadas em função do seu tamanho, índice de poli dispersão (PDI) e potencial Zeta (potencial Z). A eficiência de encapsulação foi avaliada utilizando-se o *Qubit™ Protein Assay Kit* e a toxicidade verificada por ensaios de hemólise e viabilidade celular de macrófagos murinos, da linhagem J774.16. As nanopartículas apresentaram tamanho médio de 220 nm, PDI abaixo de 0,5 e potencial Zeta de + 20 mV. A eficiência de encapsulação foi maior que 90% e não houve citotoxicidade nas primeiras 24 horas. O tratamento com as nanopartículas contendo diferentes concentrações do peptídeo P10 foi eficiente na redução da carga fúngica pulmonar, durante a PCM murina. Estes resultados mostram que a nanopartícula é estável e apresenta as características físico-químicas desejáveis para este trabalho, sendo elas capazes de reduzir de 4 a 20 vezes a concentração usual padrão do peptídeo P10.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Peptídeo P10. Vacina. Nanopartículas de quitosana.

ABSTRACT

SANTOS JUNIOR, SRS. **Peptídeo P10 complexado em nanopartículas poliméricas como vacina terapêutica intranasal para o tratamento da paracoccidioidomicose em modelo murino.** 2018. 68f. Dissertation (Masters thesis in Biological Sciences: Microbiology) – Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a disease caused by the thermo-dimorphic fungal species of *Paracoccidioides* spp. that mainly affects the lungs and can also occur systemically. The main drugs for the treatment of PCM are polyene chemotherapeutics, sulfanilamidic compounds and azoles. As an alternative for treating and / or preventing PCM, the use of vaccines has been explored, allowing the generation of a Th1-type immune response, with IFN- γproduction, important for the control of the disease. One of the most studied vaccine candidates is the P10 peptide-based vaccine, consisting of 15 amino acids (aa), which is derived from the 43 kDa glycoprotein of *P. brasiliensis*. In order to improve the immunomodulatory effect of P10 peptide, the complexation with chitosan polymer nanoparticles is being proposed in this project. Chitosan was chosen according to its physico-chemical and biological characteristics such as: biocompatibility and mucoadhesiveness, essential characteristics for this project. The nanoparticles complexed with P10 peptide at different concentrations were produced from the ionic gelation technique and their size, poly dispersion index (PDI), and Zeta potential (Z potential) were analyzed. The encapsulation efficiency was assessed using the *Qubit ™ Protein Assay Kit* and the toxicity verified by hemolysis and cell viability assays with murine J774.16 macrophages. The nanoparticles obtained presented a size of approximately 220 nm, PDI below 0.5 and Zeta potential of approximately + 20 mV. The encapsulation efficiency was greater than 90% and there was no cytotoxicity in the first 24 hours. Treatment with the nanoparticles containing different concentrations of P10 peptide was efficient in reducing lung fungal load during murine PCM. These results show that the nanoparticle is stable and presents the physico-chemical characteristics desirable in this project, being able to reduce from 4 to 20 the usual standard concentration of the peptide P10 peptide.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. P10 peptide. Vaccine. Chitosan nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa epidemiológico da PCM. (Adaptado de MARTINEZ, 2017). 18
Figura 2. Ciclo da PCM. Fonte: https://goo.gl/FPHqb9 19
Figura 3. Dimorfismo do Fungo. (A) Forma micelial; (B). Forma de levedura 20
Figura 4. Representação esquemática da resposta imune contra o fungo causador da PCM, mostrando a fagocitose da levedura de *P. brasiliensis* por macrófagos as diferentes respostas imunológicas. (Adaptado de: BENARD, 2008). 22
Figura 5. Principais drogas utilizadas no tratamento da PCM. 23
Figura 6. Diferentes tipos de Nanopartículas. (Adaptado de SOUZA; AMARAL, 2017).... 28
Figura 7. Principais polímeros utilizados para a produção de nanopartículas. 29
Figura 8. Diferença entre nanocápsulas e nanoesferas. (REZENDE et al., 2003). 29
Figura 9. Representação esquemática das placas de 96 poços e das microdiluições utilizadas nos ensaios de hemólise. 35
Figura 10. Representação esquemática das placas de 96 poços e das microdiluições utilizadas nos ensaios de citotoxicidade com macrófagos da linhagem J774.16 com o auxílio do reagente MTT. 37
Figura 11. Representação esquemática dos períodos de tempo utilizados após a infecção para os períodos de tratamento e eutanásia..... 39
Figura 12. Gráfico representativo da análise de tamanho e distribuição da homogeneidade das nanopartículas de quitosana vazias. 42
Figura 13. Toxicidade das nanopartículas de quitosana, vazias ou contendo diferentes concentrações de peptídeo P10, avaliada através de ensaio de hemólise em 2 e 6 horas. (A) Nanopartículas complexadas com peptídeo P10, (B) Nanopartículas vazias. 43
Figura 14. Citotoxicidade das nanopartículas de quitosana, contendo diferentes concentrações de peptídeo P10 avaliada em macrófagos da linhagem J774.16 com o auxílio do reagente MTT. (A) 24 Horas; (B) 72 Horas; (C) 96 Horas..... 44
Figura 15. Carga fúngica presente nos pulmões de camundongos BALB/c após 51 dias de infecção com *P.brasiliensis*, avaliada através da contagem de UFC. 45
Figura 16. Presença de citocinas anti e pró-inflamatórias nos macerados de pulmões de camundongos BALB/c após 51 dias de infecção com *P.brasiliensis*..... 46
Figura 17. Histologia dos pulmões de camundongos BALB/c após 51 dias de infecção com *P.brasiliensis*. 47
Figura 18. Histologia dos pulmões de camundongos BALB/c após 51 dias de infecção com *P.brasiliensis*. 48
Figura 19. Histologia dos pulmões de camundongos BALB/c após 51 dias de infecção com *P.brasiliensis*. 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tamanho e potencial Zeta das nanopartículas vazias e complexadas. 42

LISTA DE SIGLAS

°C – Grau Celsius
ACD – Citrato ácido dextrose
ANOVA – Analise de variância
BHI – Infusão de coração e cérebro
BR – Brasil
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EA – Eficiência de associação
FMUSP – Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo
HE – Hematoxilina eosina
HSP – Proteína de choque térmico
ICB – Instituto de Ciências Biomédicas
IFN-γ – Interferon gama
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
kDa – kilo Dalton
Ltda – Limitada
M – Molar
mg – Miligrama
miliQ – Água deionizada
mL – Mililitro
MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
mV – Milivolt
nm – Nanometro
P&D&I – Pesquisa desenvolvimento e inovação
P10 – Peptídeo 10
Pb – Paracoccidioides brasiliensis
Pl – Paracoccidioides lutzii
PBS – Tampão fosfato de sódio
PCM – Paracoccidioidomicose
PDI – Índice de polidisperção
PGA Ácido Poli-Glicólico
PLA – Ácido Poli-Lático
PLGA – Poli (Ácido Lático-Co-Ácido Glicólico)
q.s.p – Quantidade suficiente para
RNA – Ácido ribonucleico
rpm – Rotações por minuto
SFB – Soro Fetal Bovino
Th_1 – T helper 1
Th_2 – T helper 2
TPP – Tripolifosfato
UFC – Unidade formadora de colônia
US – United States
USP – Universidade de São Paulo
VLP – Partícula de tipo viral
µg – Micrograma
µL – Microlitro

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS 11
LISTA DE TABELAS 12
LISTA DE SIGLAS 13
1 INTRODUÇÃO 17
1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE 17
1.2 FUNGO 18
1.3 MODULAÇÃO DA IMUNIDADE 21
1.4 TRATAMENTO CLÍNICO 22
1.5 VACINAS EM DESENVOLVIMENTO PARA A PCM 24
1.6 NANOTECNOLOGIA 27
2 OBJETIVOS 32
2.1 Objetivo geral 32
2.2 Objetivos específicos 32
3 METODOLOGIA 32
3.1 Preparação das nanopartículas de quitosana carregadas com peptídeo P10... 32
3.2 Caracterização físico–química das nanopartículas 33
3.3 Eficiência de Associação 34
3.4 Citotoxicidade 34
3.4.1 Hemólise 34
3.4.2 Citotoxicidade 36
3.5 Ensaio de atividade antifúngica das nanopartículas contendo o peptídeo P10 37
3.5.1 Fungo 37
3.5.2 Animais 38
3.5.3 Infecção Intratraqueal 38
3.5.4 Regime de Imunização e Tratamento 39
3.5.5 Avaliação do Grau de Infecção 39
3.5.6 Análise de citocinas 40
3.5.7 Histologia do pulmão 41
3.6 Análise estatística 41
4 RESULTADOS 41
4.1 Produção e Caracterização das Nanopartículas 41
4.2 Citotoxicidade 42
4.3 Carga fúngica 44
4.4 Análise das citocinas presentes no pulmão 45
4.5 Histologia do pulmão após o tratamento 47

5 DISCUSSÃO 50
6 CONCLUSÃO..... 55
BIBLIOGRAFIA 56
LISTA DE REAGENTES 64
ANEXO A – Certificado de realização do curso de treinamento em biossegurança. 66
ANEXO B – Certificado de realização do curso de uso de animais em experimentação. 67
ANEXO C – Certificado de realização do curso de armazenamento, manuseio e descarte de produtos químicos. 68

1 INTRODUÇÃO

1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

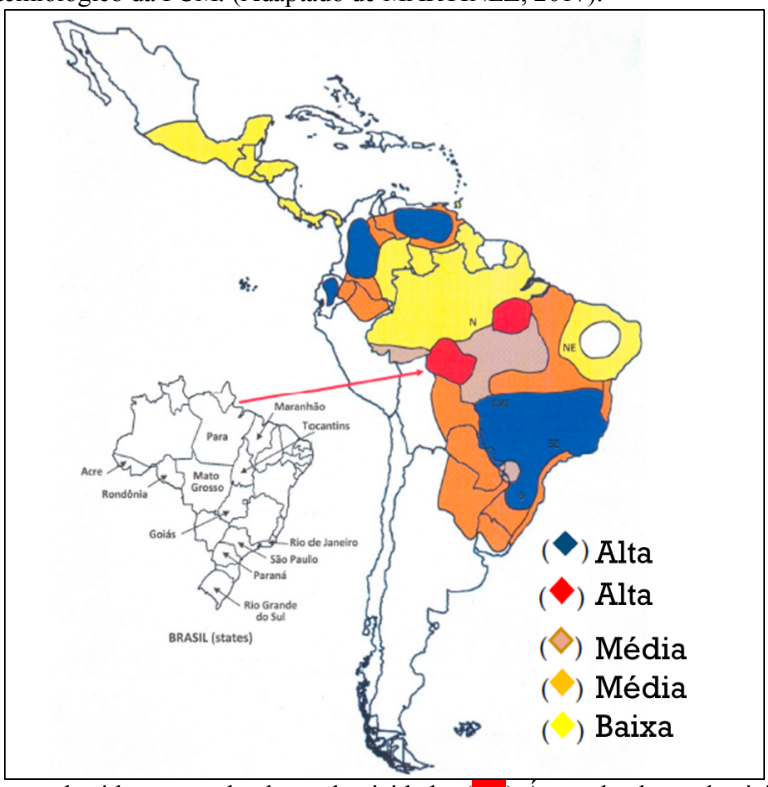
A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença que atinge primariamente os pulmões podendo também ocorrer de forma sistêmica, e é causada pelo fungo termo dimórfico *Paracoccidioides* spp. A prevalência da PCM, assim como a presença do fungo no ambiente está distribuída por quase todos os países da América Latina (Figura 1), estendendo-se do sul do México até o norte da Argentina, excluindo-se as ilhas da América Central e países como Chile, Suriname, Guiana e Guiana Francesa (PALMEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005; MARTINEZ, 2017).

No Brasil os principais focos epidemiológicos da doença se encontram nas regiões Norte, Centro-Oeste, Sul e Sudeste do país. Por não ser uma doença de notificação compulsória, não existem dados precisos sobre o número de pacientes afetados pela doença (RESTREPO; GÓMEZ; TOBÓN, 2012). Apesar de que no Estado de São Paulo exista a obrigatoriedade, os centros de Saúde não informam a Secretaria de Saúde (comunicação pessoal – Carlos P. Taborda).

A PCM pode ser classificada em duas formas clínicas: juvenil/aguda e subaguda ou adulto/crônica, sendo a fase adulto/crônica a fase onde a infecção pode ficar dormente por muitos anos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A forma juvenil é a mais agressiva com disseminação para diversos órgãos, não se restringindo ao pulmão e afeta ambos os sexos. A forma adulta da doença pode ser unifocal (pulmões) ou multifocal (disseminada), ocorrendo principalmente em indivíduos do sexo masculino, uma vez que já foi demonstrado que o estrogênio, em maior quantidade no organismo feminino, exerce fator de proteção contra a PCM (PALMEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005; RESTREPO; GÓMEZ; TOBÓN, 2012).

Figura 1. Mapa epidemiológico da PCM. (Adaptado de MARTINEZ, 2017).



( )Primeiras áreas reconhecidas como de alta endemicidade, ( ) Áreas de alta endemicidade reconhecidas a partir de 1990, ( ) Áreas com recentes evidências de aumento de endemicidade, ( ) Áreas com moderada endemicidade, ( ) Áreas com baixa endemicidade.

1.2 FUNGO

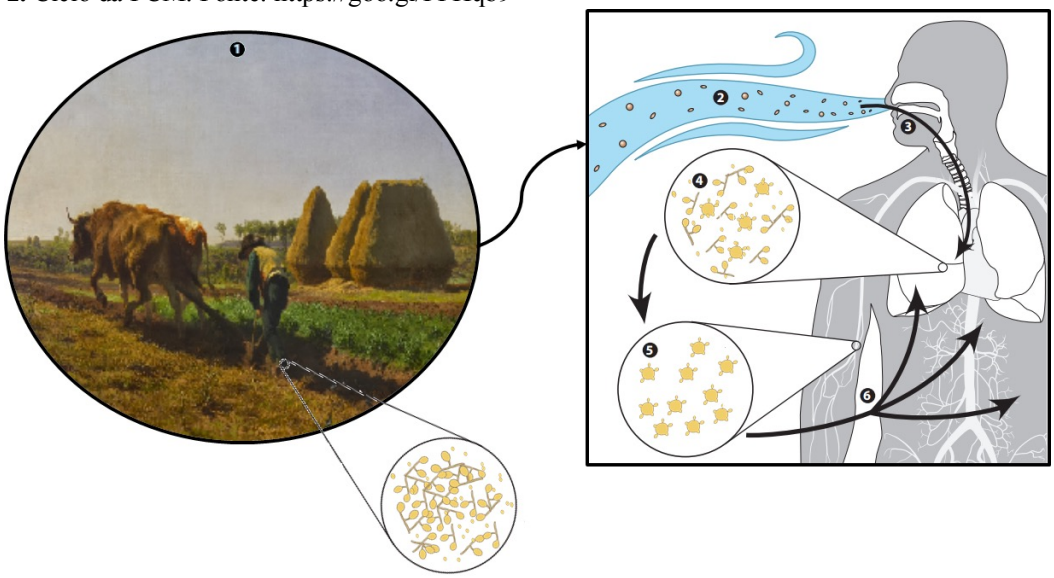
Os fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. são classificados taxonomicamente como pertencentes ao filo *Ascomycota*, classe *Euascomycetes*, ordem *Onygenales* e pertencentes a família *Ajellomycetaceae* (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002; MOREIRA, 2008; ARANTES et al., 2015).

O gênero *Paracoccidioides* é constituído de duas espécies: *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) e *Paracoccidioides lutzii* (Pl), e 4 espécies crípticas: S1, PS2, PS3 e PS4 (DE MELO TEIXEIRA et al., 2014; MARTINEZ, 2017). Com o avanço das técnicas de biologia molecular está sendo proposta uma reclassificação destas espécies subcripticas para espécies de fato definidas, sendo essas especies: *P. brasiliensis* (S1), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3) e *P. venezuelensis* (PS4) (TURISSINI et al., 2017).

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. apresentam termodimorfismo, onde na temperatura ambiente, média de 24 °C, ele é encontrado na forma de micélio e de hábito saprofítico. Apresenta como características macroscópicas colônias algodonosas e de cor branca. Microscopicamente nota-se hifas delgadas, hialinas, septadas, com produção de clamidósporos e presença de conídios, sendo encontrado no solo em regiões próximas a cursos d' água (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002; MOREIRA, 2008; ARANTES et al., 2015; MARTINEZ, 2017; MENDES et al., 2017).

A infecção pelo fungo ocorre pela inalação de conídios ou propágulos fúngicos (Figura 2) que se instalam primariamente nos pulmões podendo se espalhar pelo organismo através do sistema linfático.

Figura 2. Ciclo da PCM. Fonte: https://goo.gl/FPHqb9

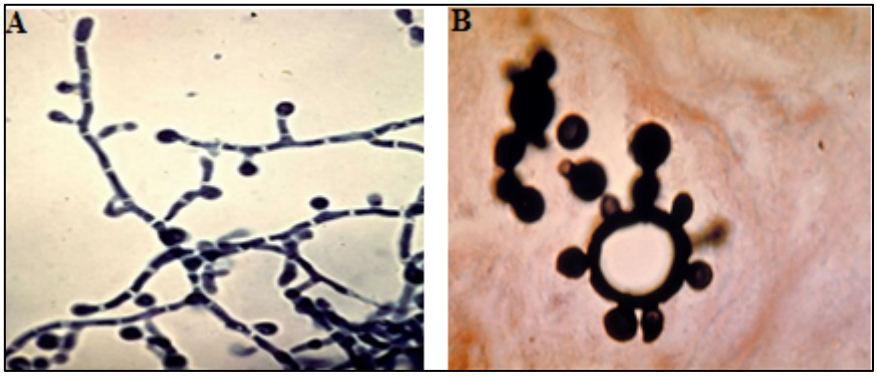


(**1**) O trabalhador rural ao arar o solo provoca a suspensão de partículas fúngicas infectantes (**2**) que ao serem inaladas (**3**) se estabelecem no pulmão, onde se transformam em leveduras devido ao estímulo do aumento da temperatura (**4**). Após a transformação em leveduras (**5**) os fungos podem ser fagocitados pelas células da resposta imune do hospedeiro, podendo ficar latente por muitos anos (fase adulto/ crônica), disseminando-se, posteriormente, por todo o organismo com a queda da imunidade (**6**) ou as leveduras podem se disseminar (**6**) pelo organismo (juvenil/ aguda e subaguda).

Com o aumento da temperatura para a média corporal de 37 °C o fungo passa da forma micelial infectante (Figura 3A) para a forma de levedura, patogênica, que apresenta macroscopicamente colônias com coloração creme e aspecto cerebriforme. Microscopicamente verificam-se formas celulares arredondadas, com paredes espessas e birrefringentes e a

presença de brotamentos (Figura 3B) (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002; MOREIRA, 2008; AMARAL et al., 2010; DE MELO TEIXEIRA et al., 2014; GEGEMBAUER et al., 2014; ARANTES et al., 2015).

Figura 3. Dimorfismo do Fungo. (A) Forma micelial; (B). Forma de levedura



Fonte: https://goo.gl/FPHqb9

Além do homem, já foi reportada a presença do fungo em animais silvestres, como preguiças, tatus entre outros mamíferos de pequeno porte, animais domésticos como cavalos e cães (MENDES et al., 2017). Isolados de *Paracoccidioides* spp. também foram encontrados em golfinhos localizados nas águas costeiras do Brasil, Estados Unidos da América e Japão, porém, a análise se baseou no estudo molecular de uma pequena região genômica, sem o isolamento do fungo (MINAKAWA et al., 2016; SACRISTÁN, 2016; VILELA et al., 2016).

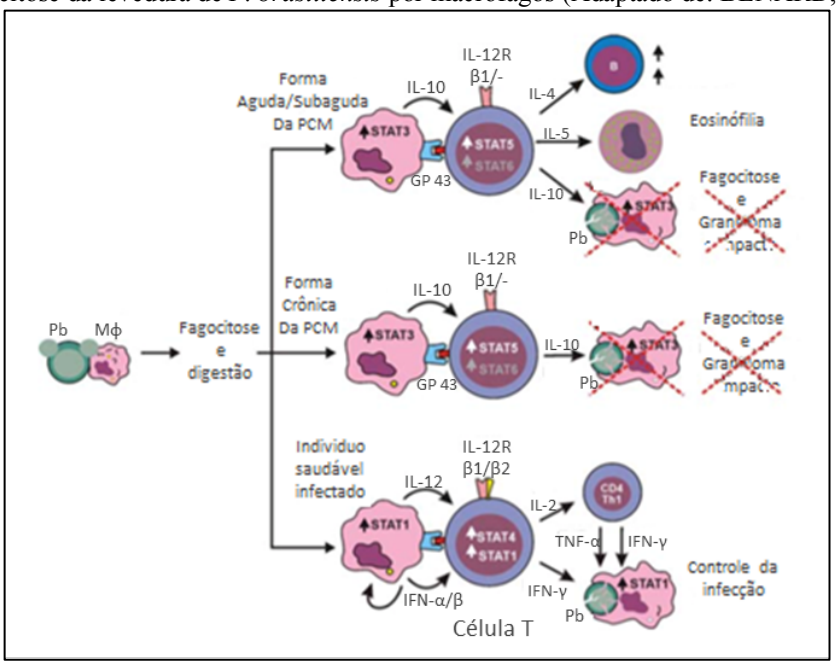
Paracoccidioides spp. é considerado um fungo fastidioso, pois seu isolamento direto da natureza é difícil, sendo necessário o emprego de técnicas moleculares e técnicas de cultivo diferenciadas para se poder estudar o microrganismo no meio ambiente e suas interações ecológicas (TERÇARIOLI et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2014; ARANTES et al., 2016).

1.3 MODULAÇÃO DA IMUNIDADE

O controle eficiente da PCM exige resposta imune predominante do tipo Th_1 com produção de IFN-γ e IL-2, promovendo a ativação e maturação de macrófagos e células T (Figura 4), responsáveis pela fagocitose e formação de granulomas (BENARD, 2008; FORTES et al., 2011), que desempenham papel fundamental no combate ao fungo, pois impede a disseminação do patógeno pelo organismo além de dificultar a replicação do mesmo (PARISE-FORTES et al., 2006; FORTES et al., 2011).

Em pacientes imunocomprometidos ou que apresentam formas mais graves da doença (aguda/subaguda) a resposta do tipo Th_2 é predominantemente observada, com títulos de anticorpos mais elevados e a resposta imune celular menos efetiva em relação aos pacientes na forma crônica (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; BENARD, 2008; FORTES et al., 2011 FORTES et al., 2011;BOCCA et al., 2013).

Figura 4. Representação esquemática das diferentes respostas imunológicas contra o fungo causador da PCM, mostrando a fagocitose da levedura de *P. brasiliensis* por macrófagos (Adaptado de: BENARD, 2008).



A presença da resposta imune do tipo Th_1, induzida pelas citocinas como IL-12 e IFN-γ, no início da infecção é de grande importância para a contenção da disseminação das leveduras, através da formação do granuloma e eliminação do fungo por meio de fagocitose e posterior morte do fungo pelos reativos de oxigênio e nitrogênio, denominado como *burst* respiratório, garantindo melhora no quadro do paciente. Também é necessária a apresentação regulada da reposta Th_2, induzida pelas citocinas como IL-4 e IL-10, com a finalidade de se evitar danos teciduais devido a reação inflamatória exagerada, a qual é induzida pelo patógeno.

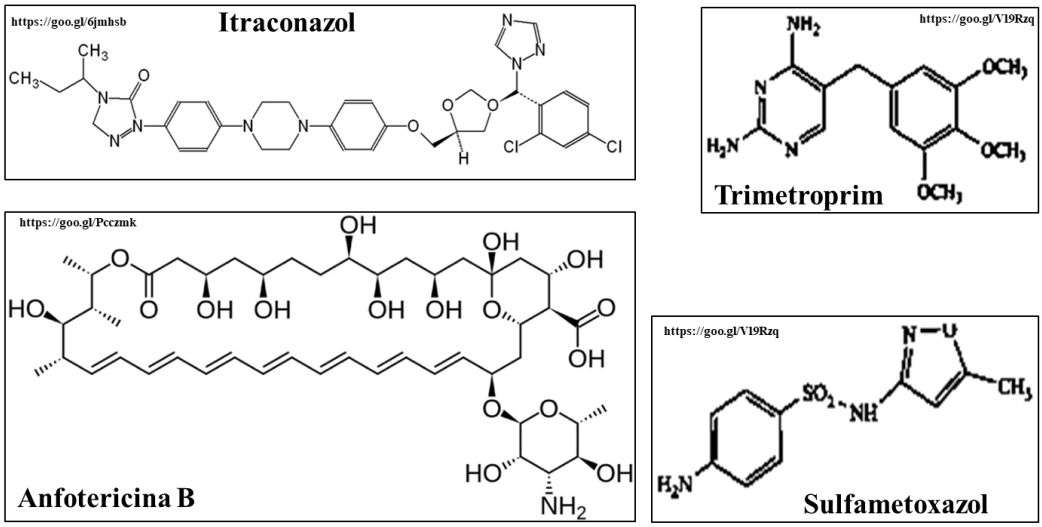
1.4 TRATAMENTO CLÍNICO

O tratamento para a PCM ocorre em duas etapas: a primeira consiste em tratamento de ataque inicial para controlar rapidamente a infecção e a segunda é usada para inibir a proliferação dos fungos remanescentes até níveis que impeçam a recidiva da doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006, 2017).

Os principais medicamentos (Figura 5) usados para o tratamento da PCM, são medicamentos do grupo de quimioterápicos poliênicos como a anfotericina B, que atuam sobre a membrana do fungo ao se ligar ao ergosterol de forma semi-específica, compostos sulfanilamídicos como a sulfadiazina, inibidora da síntese do ácido fólico, um dos precursores para a síntese de DNA ou RNA e fármacos azólicos como o itraconazol que atua inibindo a síntese do ergosterol (RESTREPO; ARANGO, 1980; BORGES et al., 2014).

Apesar desses fármacos serem bastante eficazes no tratamento da PCM e de outras micoses, eles ocasionam importantes efeitos adversos a serem observados tais como: cefaléias, distúrbios gástricos, eritemas, erupções cutâneas e nefrotoxicidade, no caso da anfotericina B (RESTREPO; ARANGO, 1980; BORGES et al., 2014; SOUZA et al., 2015).

Figura 5. Principais drogas utilizadas no tratamento da PCM.



Fonte: https://goo.gl/FPHqb9

Uma forma de diminuir os efeitos adversos indesejados dos antifúngicos, seria reduzir a concentração do fármaco, o que poderia tornar o tratamento menos eficiente, pois a concentração utilizada muitas vezes já é a mínima para se obter o efeito farmacológico desejado devido as perdas metabólicas que ocorrem naturalmente (AMARAL et al., 2009; BOCCA et al., 2013).

Para contornar esta situação, a nanotecnologia vem ganhando espaço desempenhando papel importante, pois permite não só reduzir a concentração do fármaco utilizada como também a sua liberação sustentada, reduzindo-se, assim, a necessidade de várias doses e diminuindo a toxicidade (AMARAL et al., 2009; BOCCA et al., 2013). Esse *delivery* e liberação sustentada é atingida através de diferentes tipos e formulações de nanopartículas, dentre elas, as poliméricas são as mais investigadas (AMARAL et al., 2009; BOCCA et al., 2013; SOUZA; AMARAL, 2017).

1.5 VACINAS EM DESENVOLVIMENTO PARA A PCM

O desenvolvimento de vacinas contra a PCM tem sido alvo de muitas investigações, por diversos grupos, tais como o uso de leveduras de *P. brasiliensis* atenuadas por radiação em modelo experimental (NASCIMENTO et al., 2007), o uso de leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para expressar a molécula GP 43 (ASSIS-MARQUES et al., 2015), utilização de porções proteicas purificadas de extrato de parede de *P. brasiliensis* como as porções F0 e FII (DINIZ et al., 2004), vacinas de DNA (PINTO et al., 2000; RIBEIRO et al., 2009, 2010; MARQUES et al., 2012; AMORIM et al., 2013), vacinas recombinantes (BRAGA et al., 2009), vacinas com anticorpos monoclonais (THOMAZ et al., 2014), entre outros (TRAVASSOS; TABORDA, 2012).

Um dos principais candidatos como estratégia vacinal para a PCM é a vacina com base no peptídeo P10, composto por 15 aminoácidos (QTLIAIHTLAIRYAN) e, que foi derivado da glicoproteína de 43 kDa (GP43) de *P. brasiliensis* (TABORDA et al., 1998).

O peptídeo, P10, foi selecionado entre um conjunto de peptídeos derivados da GP 43 por ter sido capaz de promover linfoproliferação mais acentuada em relação aos peptídeos comparados no estudo. A apresentação antigênica do peptídeo P10 ocorre por meio do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II do inglês *major histocompatibility complex*) (TABORDA et al., 1998). O peptídeo P10 possui a capacidade de estimular a produção de citocinas como o IFN-γ, levando a resposta imunológica predominante do tipo Th_1 (TABORDA et al., 1998) .

Ainda em modelo de PCM experimental, o peptídeo P10 foi capaz de induzir a geração de resposta imune do tipo Th_1, em camundongos imunossuprimidos com dexametasona, além de ter reduzido a carga fúngica nos pulmões desses animais. Os pesquisadores verificaram também a presença de efeito sinérgico na utilização do peptídeo P10 em conjunto aos

quimioterápicos: itraconazol e sulfametoxazol/trimetropim no tratamento experimental da micose (MUÑOZ et al., 2014).

Estudos do grupo de pesquisa do Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos, demostraram que a associação entre o peptídeo P10 e diferentes quimioterápicos, como itraconazol, sulfametoxazol/trimetropim e anfotericina B, para o tratamento da PCM é benéfica, pois o sinergismo entre os quimioterápicos e o peptídeo P10 promove a redução da carga fúngica de maneira mais eficiente quando comparado com os tratamentos em separado (somente quimioterápicos x somente peptídeo P10). A associação exibiu menor dano tecidual no órgão de tropismo da levedura, o pulmão, podendo desta forma melhorar a qualidade dos pacientes acometidos pelo fungo (MARQUES et al., 2006; MUÑOZ et al., 2014).

Outra formulação terapêutica e profilática abordada pelo grupo, foi o uso de células dendríticas, pulsadas com o peptídeo P10, o qual exibiu capacidade em reduzir a carga fúngica e aumentar a produção de citocinas do tipo Th_1. Estas células foram testadas pela via intravenosa e/ou subcutânea e, independentemente da via utilizada para a imunização houve proteção e indução de resposta celular (MAGALHÃES et al., 2012).

Já no tratamento de forma profilática da PCM a via de administração da vacina apresentou resultados divergentes, onde ao se imunizar pela via subcutânea as células se dispersaram por meio da drenagem dos vasos linfáticos, ativando células T *naive*, causando redução da carga fúngica e, pela via intravenosa, as células se dispersaram pela corrente sanguínea, e não conseguiram estimular as células necessárias para reduzir a disseminação da levedura (MAGALHÃES et al., 2012).

As células dendríticas pulsadas com o peptídeo P10 também foram utilizadas para tratar a PCM em camundongos imunossuprimidos por dexametasona. Neste estudo, foi avaliado o sinergismo das células dendríticas pulsadas com peptídeo P10 com o tratamento quimioterápico (sulfametoxazol/trimetropim) (SILVA et al., 2017). Em ambos os grupos vacinais (células

dendríticas pulsadas com peptídeo P10 coadministradas ou não com trimetoprim-sulfametoxazol) foi possivel verificar a redução da carga fúngica e aumento da produção de citocinas pró-inflamatorias, sendo que os grupos tratados com as células dendríticas pulsadas com peptídeo P10 e o sulfametoxazol/trimetropim apresentaram maiores indices de redução do fungo no hospedeiro (SILVA et al., 2017).

Vacinas de DNA para a expressão do peptídeo P10 no organismo, após a imunização, já foram alvos de investigação, o regime profilático na PCM experimental consistiu de duas formas, sendo uma para a expressão somente do peptídeo P10 (AMORIM et al., 2013) e outra para a expressão do peptídeo P10 e da citocina IL-12, concomitantemente (RITTNER et al., 2012). Em ambos os ensaios, as vacinas proporcionaram contenção da carga fúngica e elevação da produção de citocinas pró-inflamatórias (AMORIM et al., 2013; RITTNER et al., 2012).

Vacinas de peptídeos quiméricos, recombinantes, produzidas a partir da fusão da Flagelina de *Salmonella enterica* (Flic C) com o peptídeo P10, foram testadas na profilaxia da PCM em modelo experimental murino. A via intranasal foi utilizada para as imunizações, mudando pela primeira vez a forma clássica dos tratamentos vacinais, onde as vias tradicionalmente são: intramusculares, subcutâneas e intravenosas. Este estudo mostrou que a via intranasal é uma ótima alternativa para a geração de uma vacina profilática contra a PCM, pois é uma via que permite a fácil aplicação da vacina além de promover uma resposta imune capaz de conter as leveduras nos pulmões e evitar a disseminação para outros órgãos de tropismo da levedura, em camundongos infectados e ainda, estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais são protetoras nesta micose (BRAGA et al., 2009).

Uma abordagem diferente e interessante utilizada para a geração de vacinas contra micoses em modelo experimental murino, é pautada no uso de partículas para proteger e carrear o peptídeo P10 ou outros peptídeos (AMARAL et al., 2010; HOLANDA et al., 2017; SOUZA; AMARAL, 2017).

Foram estudadas vacinas de partículas de tipo viral (VLP do inglês *vírus like particles*), que são pequenas partículas carreadoras construídas a partir de proteínas do capsídeo viral, no estudo desenvolvido por HOLANDA e colaboradores (2017), estas partículas foram feitas a partir de proteínas do capsídeo do vírus da Hepatite B (HBcAg) fusionadas com peptídeo P10. As proteínas HBcAg tem a capacidade de se "auto montar" mesmo com sua estrutura modificada, formando as partículas carreadoras complexadas com o peptídeo P10 na estrutura do VLP. Os resultados obtidos deste estudo mostraram que a vacina tem a capacidade de promover a diminuição da carga fúngica no pulmão e estimular a resposta imune do tipo Th_1.

A eficácia do uso de nanopartículas de PLGA ,para o *delivery* e liberação sustentada de fármacos e moléculas bioativas como o peptídeo P10, já foi avaliada no tratamento da PCM experimental, como pode ser comprovada por alguns trabalhos, os quais mostraram redução considerável da carga fúngica, aumento da produção de IFN-γ, redução da molécula carreada (peptídeo P10) e a liberação sustentada do princípio ativo por um longo período de tempo. As nanopartículas oferecem proteção ao peptídeo contra o ataque de enzimas biológicas que degradam a molécula e reduzem o efeito imuno modulador quando estão livres no organismo. (AMARAL et al., 2009, 2010; SOUZA; AMARAL, 2017).

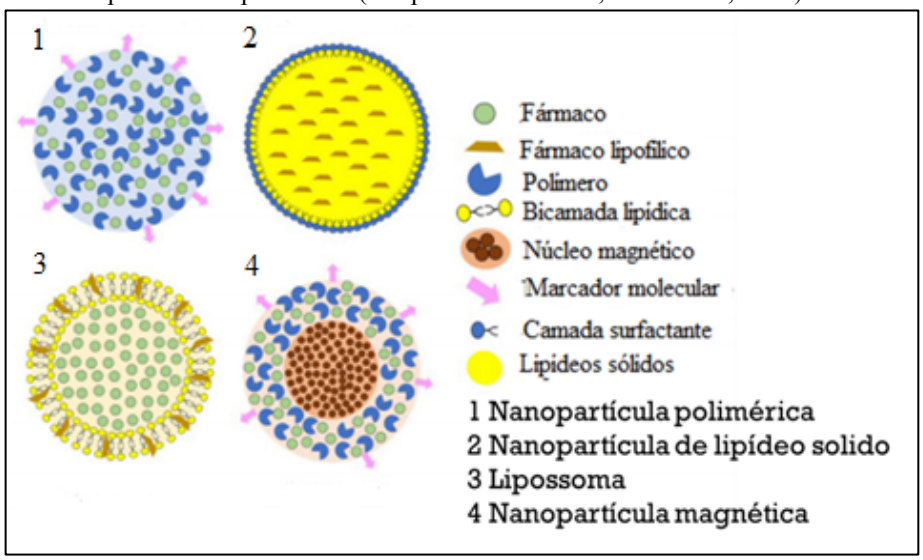
1.6 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é a ciência que estuda e busca utilizar de diversas maneiras diferentes materiais na escala nanométrica, a qual varia de 1 a 1000 nm (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007). Atualmente, esta ciência vem sendo amplamente aplicada no cotidiano das pessoas, desde aparelhos eletrônicos com a finalidade de torná-los mais rápidos, leves e mais potentes (BHATTACHARYYA; SINGH; SATNALIKA, 2009; PARK; VOSGUERICHIAN; BAO, 2013; ZENG et al., 2014; FAN; TANG; WANG, 2016), as aplicações na área da saúde, diretamente como no caso da nanomedicina e nanocosmetologia (EMERICH; THANOS, 2003; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007; RAJ et al., 2015), e indiretamente com o uso de

nanopartículas de prata em tambores de máquinas de lavar roupa, com o objetivo de eliminar microrganismos (VASCONELOS, 2007).

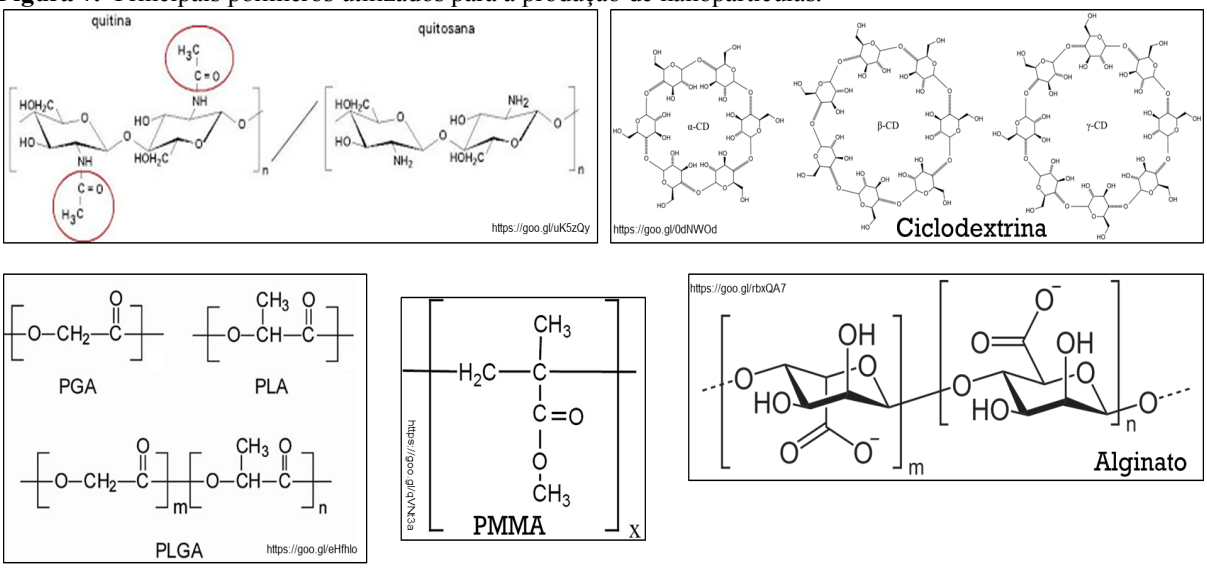
Nas aplicações voltadas para a saúde existem diversos tipos de nanopartículas (Figura 6) que podem ser utilizadas, e isto é definido pela aplicação e pelo que se deseja de efeito final para o uso destas nanoestruturas (EMERICH; THANOS, 2003; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007). As principais nanopartículas utilizadas na área da saúde são os lipossomas, nanopartículas de lipídeos sólidos, nanopartículas magnéticas, nanopartículas com base em diferentes tipos de metais (ouro, prata) e as nanopartículas poliméricas (EMERICH; THANOS, 2003; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Figura 6. Diferentes tipos de Nanopartículas. (Adaptado de SOUZA; AMARAL, 2017).



Existem diversos tipos de nanopartículas poliméricas preparadas a partir de diferentes materiais. As características físicas e químicas destas nanopartículas são definidas a partir dos materiais (monômeros e ou polímeros) (Figura 7) utilizados, bem como, a sua concentração. Os monômeros mais utilizados são a quitosana, Ácido Poli-Lático (PLA), Ácido Poli-Glicólico (PGA), Poli(Ácido Lático-Co-Ácido Glicólico) (PLGA), alginato, dentre outros (AHMED; ALJAEID, 2016; BOLHASSANI et al., 2014; CARCABOSO et al., 2004; CSABA; GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2009).

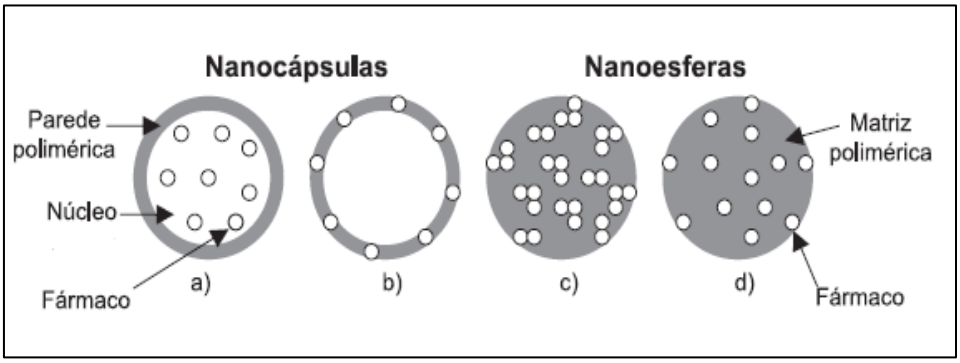
Figura 7. Principais polímeros utilizados para a produção de nanopartículas.



Fonte: Alterado de https://goo.gl/FPHqb9

As nanopartículas (Figura 8) podem ser caracterizadas em nanocápsulas que apresentam o seu interior (núcleo) oco, podendo ser este interior aquoso ou oleoso, no qual o princípio ativo fica disperso no núcleo, ou nanoesferas que são matrizes poliméricas maciças onde o fármaco fica distribuído em toda a estrutura (REZENDE et al., 2003).

Figura 8. Diferença entre nanocápsulas e nanoesferas. (REZENDE et al., 2003).



A quitosana é um polímero que atrai a atenção para uso como nanomaterial, devido às suas características tais como ser biodegradável e biocompatível (KEAN; THANOU, 2010). Ele é derivado da quitina, que é encontrada em diferentes espécies de animais vertebrados e invertebrados, como os insetos e crustáceos (CAMPANA-FILHO et al., 2007; BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008), e é também encontrada como um dos constituintes da parede

celular de fungos. A quitosana é obtida pela desacetilação da quitina (CAMPANA-FILHO et al., 2007; BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008; KEAN; THANOU, 2010).

A quitosana tem diversas aplicações, podendo ser usada para a perda de gordura corporal (NI MHURCHU et al., 2004, 2005), na cicatrização de feridas (DAI et al., 2011; BANO et al., 2017), como adjuvante vacinal devido à sua capacidade de estimular a resposta imune Th1 (MUZZARELLI, 2010; CARROLL et al., 2016; RITEAU; SHER, 2016) e ainda na forma de nanopartículas, devido as suas características de mucoadesividade (HUSSAIN, 1998; ILLUM et al., 2001; ILLUM, 2003; CASETTARI; ILLUM, 2014; XIA et al., 2015).

Diversos estudos já demonstraram que o uso das nanopartículas de quitosana, como adjuvantes ou como carreador de fármacos, DNA/ RNA, peptídeos ou proteínas, aumentou significativamente o efeito desejado para o qual as nanopartículas foram empregadas, e isso se deve as características físico/químicas que a associação destes compostos com estas nanopartículas apresentaram (READ et al., 2005; PAN et al., 2014; ZHAO et al., 2014;KHALILI et al., 2015; LEBRE et al., 2016; JESUS et al., 2016).

A característica que mais chama a atenção nas nanopartículas de quitosana é a sua capacidade de ser mucoadesiva, mas há outras propriedades relevantes, tais como biocompatibilidade, fácil obtenção e preparação. A capacidade de mucoadesão é essencial em formulação para aplicação em mucosas, já que nestas regiões ocorrem fenômenos de degradação e *clearence* causados pelo deslocamento de partículas estranhas pelas paredes das mucosas (BERNSTEIN, 1992; MYGIND; DAHL, 1998; MARTTIN et al., 1998; KYD; FOXWELL; CRIPPS, 2001;ILLUM, 2003). Esta mucoadesividade promove a aderência das nanopartículas, aumentando o tempo de contato das mesmas com o organismo e levando assim a uma melhor resposta (ILLUM; FARRAJ; DAVIS, 1994; HUSSAIN, 1998; ILLUM et al., 2001; VAN DER LUBBEN et al., 2001; ILLUM, 2003; CASETTARI; COSTANTINO et al.,

2007; CSABA; GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2009; GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2012; ILLUM, 2014).

Este projeto, envolveu etapas de P&D&I (Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação), visando o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas para carreamento do peptídeo P10, pelas vias respiratórias. Apesar das vacinas com base no peptídeo P10 se mostrarem muito promissoras, elas ainda apresentam uma vida útil curta para o tratamento, já que peptídeos são rapidamente degradados pelo organismo se não possuírem uma forma de proteção. Para contornar esta situação, a concentração de peptídeo a ser utilizada é geralmente maior do que a necessária, aumentando assim o custo de produção da vacina. Uma alternativa para contornar este problema se dá pela utilização de nanopartículas, pois além dos benefícios que já foram citados acima, elas possibilitam uma maior proteção e estabilidade do peptídeo, além de serem capazes de modular o sistema imune, diminuindo a necessidade de adjuvantes vacinais.

Em busca de uma formulação terapêutica que diminua o custo de produção, que seja efetiva em promover proteção imunológica no tratamento da PCM experimental e que reduza o desconforto dos pacientes, este trabalho propõe uma vacina para uso intranasal produzida a partir de nanopartículas de quitosana carreando o peptídeo P10.

A via intranasal foi escolhida por promover imunidade local e sistêmica contra a PCM e contra diversas outras doenças e, por já ter sido demonstrado que esta via de imunização foi a que demonstrou a melhor proteção imunológica, utilizando-se o peptídeo P10 e por ser uma via de fácil acesso, diminuindo assim a necessidade de injeções invasivas e de profissionais especializados para a aplicação das vacinas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estabelecer uma vacina contra a PCM utilizando-se nanopartículas de quitosana para *delivery* e liberação sustentada do peptídeo P10.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar a construção de nanopartículas de quitosana contendo diferentes concentrações do peptídeo P10.
- Caracterizar as nanopartículas quanto ao tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta.
- Determinar a eficiência de associação do peptídeo P10 às nanopartículas de quitosana.
- Investigar a citotoxicidade das nanopartículas em macrófagos e em hemácias.
- Verificar a melhor concentração do peptídeo P10 nas nanopartículas capaz de gerar uma resposta imune adequada para a PCM quando entregue por via intranasal.
- Avaliar a atividade antifúngica das nanopartículas contendo o peptídeo P10 através da verificação da carga fúngica no modelo murino para a PCM.
- Quantificar as citocinas presentes no pulmão dos camundongos após infecção e tratamento.
- Avaliar a histopatologia dos órgãos afetados pela PCM após o tratamento com as nanopartículas de peptídeo P10.

3 METODOLOGIA

3.1 Preparação das nanopartículas de quitosana carregadas com peptídeo P10

As nanopartículas foram preparadas pela técnica da gelificação iônica de acordo com o protocolo de CALVO et al., (1997) modificado por NEVES et al., (2014).

Inicialmente, 60 mg do polímero (quitosana baixo peso molecular) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US*) foram diluídos em 20 mL de água miliQ com 174 µL de ácido acético 0.1

M. O polímero foi dissolvido com o auxílio de um agitador magnético por 1 hora e 30 minutos. Em seguida o pH da solução foi ajustado para 4.4 com solução de NaOH 0.1 M e o volume final da solução foi ajustado para 30 mL com água miliQ. Para a solução do tripolifosfato (TPP) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US*) foram dissolvidos 14 mg de TPP em 14 mL de água miliQ.

Para a formação das nanopartículas 250 µL de peptídeo P10 (*Aminotech Pesquisa e Desenvolvimento Ltda, Diadema, São Paulo, BR*) solubilizado em diferentes concentrações de peptídeo P10 sendo essas: 0 (nanopartícula vazia), 1, 5 e 20 µg.10 μL^{-1} de peptídeo P10, foram misturados com 1,13 ml de solução de TPP, em seguida à solução de TPP + peptídeo P10 foi gotejada vagarosamente em 2,12 mL de solução de quitosana sob agitação de 50-75 rpm (rotações por minuto) até acabar toda a solução de TPP + peptídeo P10.

Ao término da adição da solução de TPP + peptídeo P10 à solução de quitosana, a mistura ficou sob agitação pelo período de uma hora em agitador magnético. Em seguida a solução foi centrifugada por 1 hora a 13200 rpm a 4 °C em microtubos, o sobrenadante foi coletado e usado para posterior análise da eficiência de associação. O pellet contendo as nanopartículas foi ressuspendido em 1 mL de PBS e foram armazenadas a 4 °C até o momento do uso. Todos as nanopartículas foram feitas em triplicata.

3.2 Caracterização físico–química das nanopartículas

- Tamanho

O tamanho das nanopartículas formadas foi avaliado pela técnica da espectroscopia de correlação de fótons medido em nm (nanômetros).

- Índice de polidispersão (PDI)

O índice de polidispersão foi analisado pela técnica do espalhamento dinâmico de luz.

- Potencial Zeta

O potencial Zeta (potencial Z) foi determinado pelo método de mobilidade eletroforética medido em mV (milivolts).

3.3 Eficiência de Associação

A Eficiência de Associação (EA) foi realizada pela quantificação do peptídeo P10 não complexado, presente no sobrenadante por meio do *Qubit™ ProteinAssay Kit* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US*).

O sobrenadante das nanopartículas vazias foi utilizado como o branco nas medições. A EA foi calculada usando a seguinte equação:

$$EA = \frac{\text{peptídeo P10 total} - \text{peptídeo P10 livre no sobrenadante}}{\text{peptídeo P10 total}} x100$$

Equação 1: Calculo da eficiência de associação.

3.4 Citotoxicidade

Para se avaliar a citotoxicidade das nanopartículas vazias ou complexadas com peptídeo P10 foram realizados ensaios de hemólise e ensaio de toxicidade celular pelo método do MTT(*Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US*) (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio) utilizando a metodologia adaptada de SOUZA et al., 2015. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4.1 Hemólise

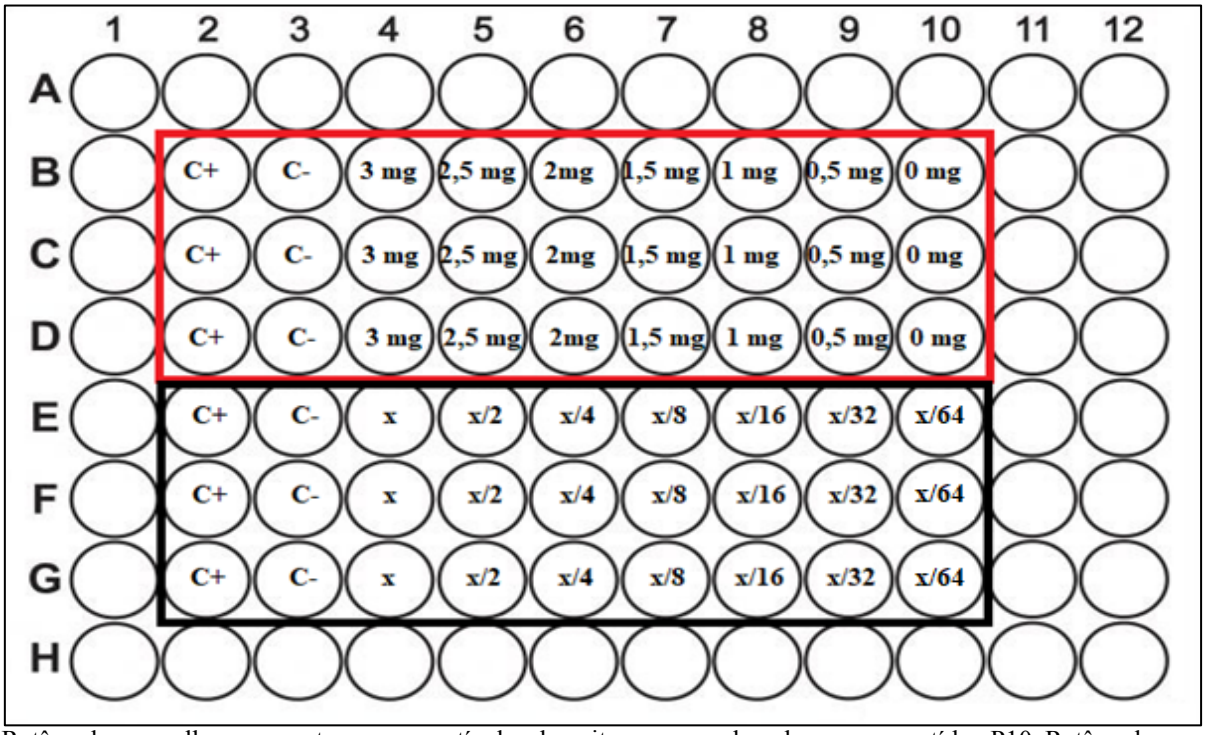
O sangue fresco foi coletado de voluntários saudáveis e posteriormente armazenado em tubos contendo 250 µL do anticoagulante Citrato Ácido Dextrose (ACD do inglês *Acid Citrate Dextrose*) por mL de sangue.

As hemácias foram separadas por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e as células foram lavadas com PBS por 3 vezes. As hemácias foram então diluídas em PBS com uma proporção de 3:11 (hemácias:PBS).

Para a realização do ensaio foram utilizadas microplacas de 96 poços (Figura 9), onde utilizou-se 20 μL de hemácias para 200 μL de nanopartículas vazias ou complexadas com peptídeo P10.

Água destilada e autoclavada foi utilizada como controle positivo para hemólise (100% de hemólise) e como controle negativo foi utilizado o PBS (mínima ou nenhuma hemólise). As nanopartículas foram distribuídas nos poços em diluições seriada de base 2. A maior concentração das nanopartículas vazias, a concentração das nanopartículas após a sua obtenção foi considerada como sendo 1x, devido ao fato de não ser possível determinar a quantidade de nanopartículas formadas em uma solução, sendo assim as diluições das nanopartículas vazias variou de 1x a 2^{-6}x. A concentração do peptídeo P10 variou de 3 mg/mL a 0 mg/mL.

Figura 9. Representação esquemática das placas de 96 poços e das microdiluições utilizadas nos ensaios de hemólise.



Retângulo vermelho representa as nanopartículas de quitosana complexadas com o peptídeo P10. Retângulo preto representa as nanopartículas de quitosana vazias em diferentes diluições.

As placas foram incubadas por 2 e 6 horas, uma placa para cada período de tempo avaliado, a 37 °C e 5% de CO_2. Após os períodos de incubação as placas foram centrifugadas

a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outra microplaca de 96 poços e foi deixado a temperatura ambiente por 30 minutos para a oxidação da hemoglobina das hemácias lisadas. Após esse tempo foram-se medidas as absorbâncias dos sobrenadantes utilizando um espectrofotômetro de placas a 540 nm.

O cálculo da porcentagem de hemólise foi realizado utilizando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ hemólise} = (100 x A_H)/A_{dH2O}$$

Equação 2: Calculo da porcentagem de hemácias lisadas.

Onde: **AH**: Absorbância da amostra, **AdH2O**: Média das absorbâncias das amostras tratadas com água destilada.

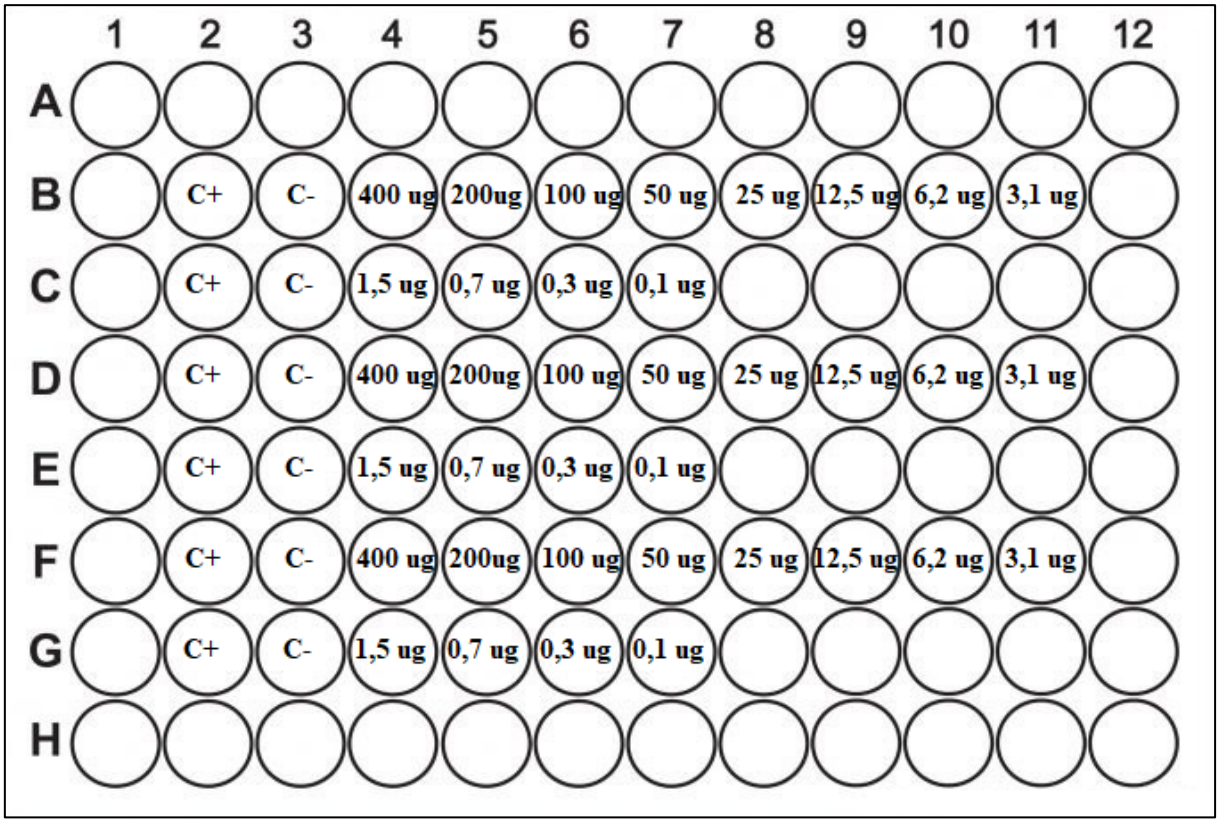
3.4.2 Citotoxicidade

Macrófagos murinos da linhagem J774.16 foram utilizados para avaliar a toxicidade das nanopartículas. Os macrófagos foram mantidos em meio DMEM (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, BR) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US*).

Preparou-se uma suspensão contendo $5x10^4$células/mL, 20 µL da mesma foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo chato. Foram acrescentados 180 µL de DMEM (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, BR) suplementado com 10% de SFB (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US*) contendo as nanopartículas com diferentes massas de peptídeo P10 (Figura 10) variando de 400 µg a 0,19 µg.

Após 24, 48 e 72 horas de incubação com as nanopartículas, acrescentou-se 20 µL de MTT (*Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US*) a 5 mg/mL e incubou-se a 37 °C com 5 % CO_2 por 4 horas. Em seguida os sobrenadantes foram descartados e em cada poço acrescentou-se 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US*). Foi realizada a leitura das placassem um espectrofotômetro de microplacas a 540 nm.

Figura 10. Representação esquemática das placas de 96 poços e das microdiluições utilizadas nos ensaios de citotoxicidade com macrófagos da linhagem J774.16 com o auxílio do reagente MTT.



O cálculo da porcentagem de células vivas foi realizado utilizando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ células vivas} = (100 x A_V)/A_{DMEM}$$

Equação 3: Calculo da porcentagem de macrófagos viáveis.

Onde: $\mathbf{A_V}$: Absorbância da amostra, $\mathbf{A_{DMEM}}$: Média das absorbâncias das amostras tratadas com meio nutritivo.

3.5 Ensaio de atividade antifúngica das nanopartículas contendo o peptídeo P10

3.5.1 Fungo

Para a infecção dos animais, foi utilizado o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* isolado Pb 18 mantido na forma de levedura em meio sólido Fava Neto. Posteriormente as leveduras foram transferidas para o meio líquido BHI (*Bacto*^{tm}*Brain Heart Infusion*) (*BD Franklin Lakes, Nova Jersey, US*) suplementado com 4% de Soro Fetal Bovino (*Gibco, Thermo Fisher*

Scientific, Waltham, Massachusetts, US) e 4% de glicose e mantidas sob agitação a 37 °C e 160 rpm por 5 a 7 dias antes da infecção.

O fungo foi coletado e lavado por três vezes utilizando-se PBS, ao final das lavagens os fungos foram ressuspendidos em 5 mL de PBS para precipitar as maiores partículas fúngicas e manter no sobrenadante somente as partículas menores. A viabilidade das células fúngicas foi avaliada pela contagem em câmara de Neubauer usando o corante verde Janus (SOUZA et al., 2015) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US*).

3.5.2 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, machos, livre de patógenos com idade entre 6 - 8 semanas, mantidos em gaiolas de polipropileno com acesso a água e alimento *ad libitum*, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina – FMUSP. Os animais foram mantidos no Biotério de experimentação do departamento de microbiologia situado no Instituto de Ciências Biomédicas II e utilizados de acordo com certificado aprovado pela CEUA ICB sob o protocolo n° 65/2016 e normas estabelecidas pelo CONCEA.

Foram utilizados ao todo 21 grupos de animais com n = 7 animais em cada grupo, sendo eles: **grupo I -** controle positivo infectados sem tratamento (Pb 18), **grupo II -** infectados e tratados com nanopartículas vazias e 20µg/10µL de peptídeo P10 livre (Nano+P10), **grupo III -** infectados e tratados com as nanopartículas vazias (0), **grupo IV -** infectados e tratados com as nanopartículas complexadas com 1µg/10µL de peptídeo P10 (1 µg), **grupo V** - infectados e tratados com as nanopartículas complexadas com 5µg/10µL de peptídeo P10 (5 µg), **grupo VI -** infectados e tratados com as nanopartículas complexadas com 20µg/10µL de peptídeo P10 (20 µg) e **grupo VII –** SHAM (não infectados e não tratados).

3.5.3 Infecção Intratraqueal

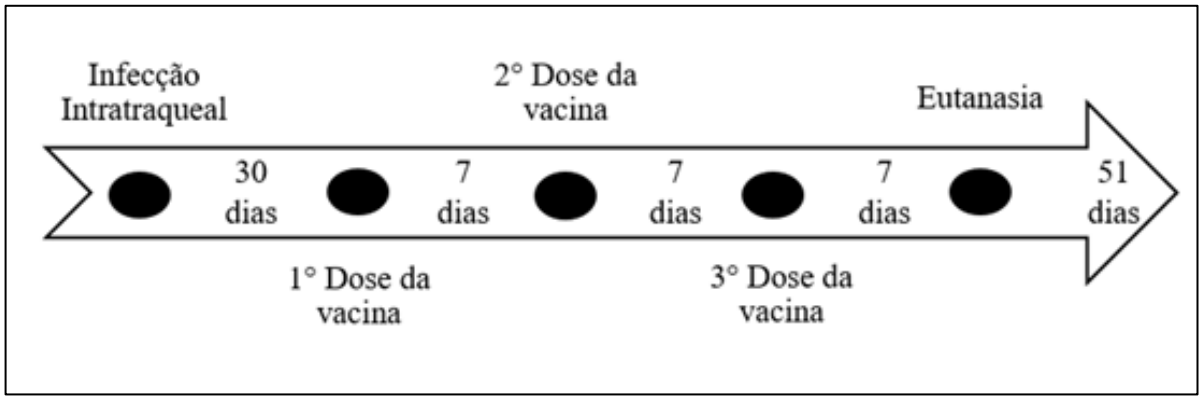
Para simular a infecção com a PCM os camundongos BALB/c foram infectados com *P. brasiliensis* isolado Pb 18 com uma concentração de $3x10^5$ células.50 μL^{-1} de leveduras. Os

animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com 200 µL de solução contendo 80 $mg.kg^{-1}$ de ketamina e 10 $mg.kg^{-1}$ de xilazina, quando os animais não apresentaram reação a nenhum estímulo, indicando o efeito anestésico, foi feita uma incisão na traqueia e com o auxílio de uma seringa, foi inoculado 50 µL da suspensão de leveduras. Após a infecção, os camundongos foram suturados e mantidos aquecidos até a recuperação da anestesia.

3.5.4 Regime de Imunização e Tratamento

Após 30 dias de infecção os camundongos receberam por via intranasal as vacinas de nanopartículas carregadas com o peptídeo P10 em diferentes concentrações durante três semanas uma vez por semana (Figura 11). Foram administrados 5 µL de vacina em cada narina, resultando no final em 30 µL de vacina por camundongo.

Figura 11. Representação esquemática dos períodos de tempo utilizados após a infecção para os períodos de tratamento e eutanásia.



3.5.5 Avaliação do Grau de Infecção

O grau de infecção foi avaliado pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) provenientes de partículas fúngicas viáveis presentes no pulmão dos camundongos, após 51 dias de infecção. A recuperação das colônias foi realizada em meio infusão de cérebro-coração (BHI do inglês *Brain Heart Infusion*) (*Bacto*^{tm}*, BD Franklin Lakes, Nova Jersey, US*) suplementado com 4% de Soro Fetal Bovino (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US*), 4% (vol/vol) de Glicose (*Difico*^{tm}*, BD Franklin Lakes, Nova Jersey, US)*, 5% (vol/vol) de filtrado de cultura do isolado 192 de *P. brasiliensis* (Modificado de: SOUZA

et al., 2015) utilizado devido a fatores de crescimento produzidos por esta cepa em meio MMcM e 20 μg/mL de Gentamicina.

Após a eutanásia dos animais em câmara de CO_2, os pulmões foram assepticamente removidos e cortes histológicos do tecido foram selecionados ao acaso para se avaliar a preservação celular do órgão após o tratamento. A pesagem dos órgãos ocorreu após as retiradas dos cortes histológicos.

Com o auxílio de um macerador manual de tecido, o órgão foi macerado em 2 mL de PBS 1x, e dessa solução foi feita uma diluição de 10x, onde 100 μL da solução diluída foi plaqueada e incubada a 37 °C. 500 μL da solução de macerado pulmonar foi alíquotada em microtubos, os quais continham 500 μL da solução de inibidor de protease (*Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US*) para posterior avaliação das citocinas. As colônias foram contadas até o dia 21 pós eutanásia.

3.5.6 Análise de citocinas

Para a análise de citocinas foram realizados ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando-se kits comerciais (*BD OptEIA™, BD Franklin Lakes, Nova Jersey, US*) para as seguintes citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN-γ

As placas para o ensaio de ELISA foram sensibilizadas com 100 μL dos anticorpos de captura e mantidas a 4 ºC overnight. As placas foram então lavadas com PBS – *Tween* 20 (0,05%) e bloqueadas com 200 μL de *Assay Diluent* (PBS - 10% Soro Fetal Bovino) por uma hora, a temperatura ambiente. Após serem novamente lavadas, foi acrescentado aos poços 100 μL das amostras ou das citocinas recombinantes de camundongos (padrão), realizando-se as diluições necessárias, e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por duas horas.

Após esse período, as placas foram novamente lavadas com PBS – Tween 20 (0,05%) e forma adicionados 100 μL do conjugado, composto dos anticorpos de detecção e a enzima.

Assim, as placas foram novamente incubadas por uma hora, à temperatura ambiente. Mais uma etapa de lavagem dos poços foi realizada e foram acrescentados 100 µL do substrato da enzima. As placas foram incubadas no escuro, a temperatura ambiente por trinta minutos e a reação foi parada com 50 µL/poço de H_3PO_4 1 M.

A leitura foi realizada em leitor de microplacas *Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, US)* no comprimento de onda de 450 nm.

3.5.7 Histologia do pulmão

Após a retirada dos pulmões e antes da maceração, cortes histológicos do tecido foram selecionados ao acaso entre os grupos estudados e fixados em formalina 10% tamponada, onde posteriormente foram enviados a empresa terceirizada, para a inclusão do material em parafina e confecção das lâminas histológicas em coloração com hematoxilina – eosina (HE) para avaliação em microscopia óptica, parâmetros como preservação da estrutura celular do órgão e quantidade de leveduras foram analisados.

3.6 Análise estatística

Foram realizados os testes estatísticos: teste t e teste de análise de variância (ANOVA do inglês *analysis of variance*), com pós-testes de Tukey ou Dunnett, com o auxílio do programa de computador (*GraphPad Prism 6*) com a finalidade de demonstrar a efetividade das nanopartículas de quitosana contendo diferentes concentrações de peptídeo P10 na melhora da resposta imune contra a PCM. Os valores de P foram considerados significativos quando <0,05 e as barras de erros foram expressas como erro padrão da media (SEM do inglês *standard error of the mean*).

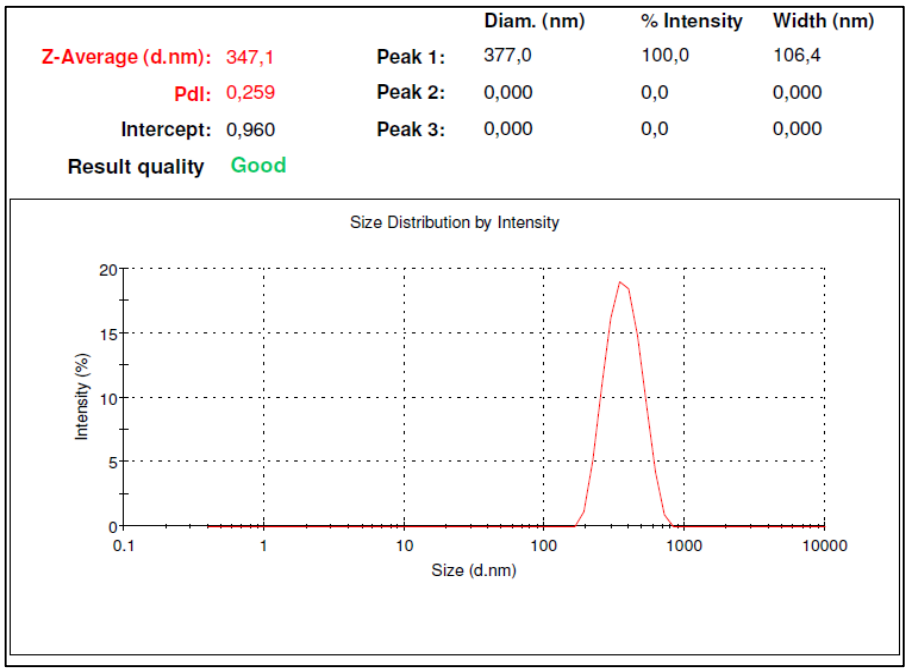
4 RESULTADOS

4.1 Produção e Caracterização das Nanopartículas

As nanopartículas de quitosana apresentaram um PDI inferior a 0,5 indicando homogeneidade no tamanho das partículas (Figura 12). A eficiência de encapsulação do

peptídeo foi acima de 90%. Os tamanhos e potencias Z (Tabela 1) apresentaram os valores esperados para este tipo de formulação, levando em conta o método de preparação e os materiais utilizados.

Figura 12. Gráfico representativo da análise de tamanho e distribuição da homogeneidade das nanopartículas de quitosana vazias.



Neste gráfico é possível visualizar a qualidade e homogeneidade das nanopartículas de quitosana, uma vez que seu PDI ficou abaixo de 0,5. O gráfico apresentou um único pico. Isto demonstra que as nanopartículas de quitosana apresentam uma única distribuição uniforme de tamanho.

Tabela 1. Tamanho e potencial Zeta das nanopartículas vazias e complexadas.

	VAZIA	COMPLEXADA
TAMANHO	338 ± 8 nm	226 ± 14 nm
POTENCIAL Z	40,6 ± 1,5 mV	19,6 ± 3,5 mV

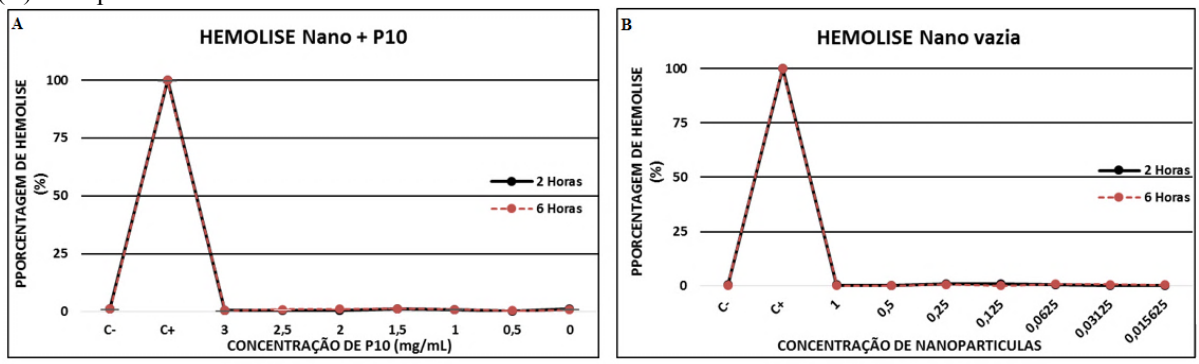
As nanopartículas de quitosana apresentaram tais características devido ao fato de como são fabricadas e dos materiais utilizados. Devido as interações ente a quitosana o TPP e o peptídeo P10 as nanopartículas complexadas apresentaram tamanho e carga de superfícies menores em relação as nanopartículas vazias. Devido ao fato de seus tamanhos se encontrarem na escala nanométrica e de seus potenciais Z serem positivos é esperado uma interação maior com a membrana de caráter negativo da célula, levando a uma melhor internalização das partículas.

4.2 Citotoxicidade

Ambas as nanopartículas vazias ou nanopartículas incorporadas com o peptídeo P10 não apresentaram toxicidade nos ensaios de hemólise nos tempos de 2 e 6 horas (Figura 13), a

análise estatística não mostrou relevância significativa quando se comparou os resultados de hemólise entre as diferentes concentrações de peptídeo P10 quanto a de nanopartículas vazias.

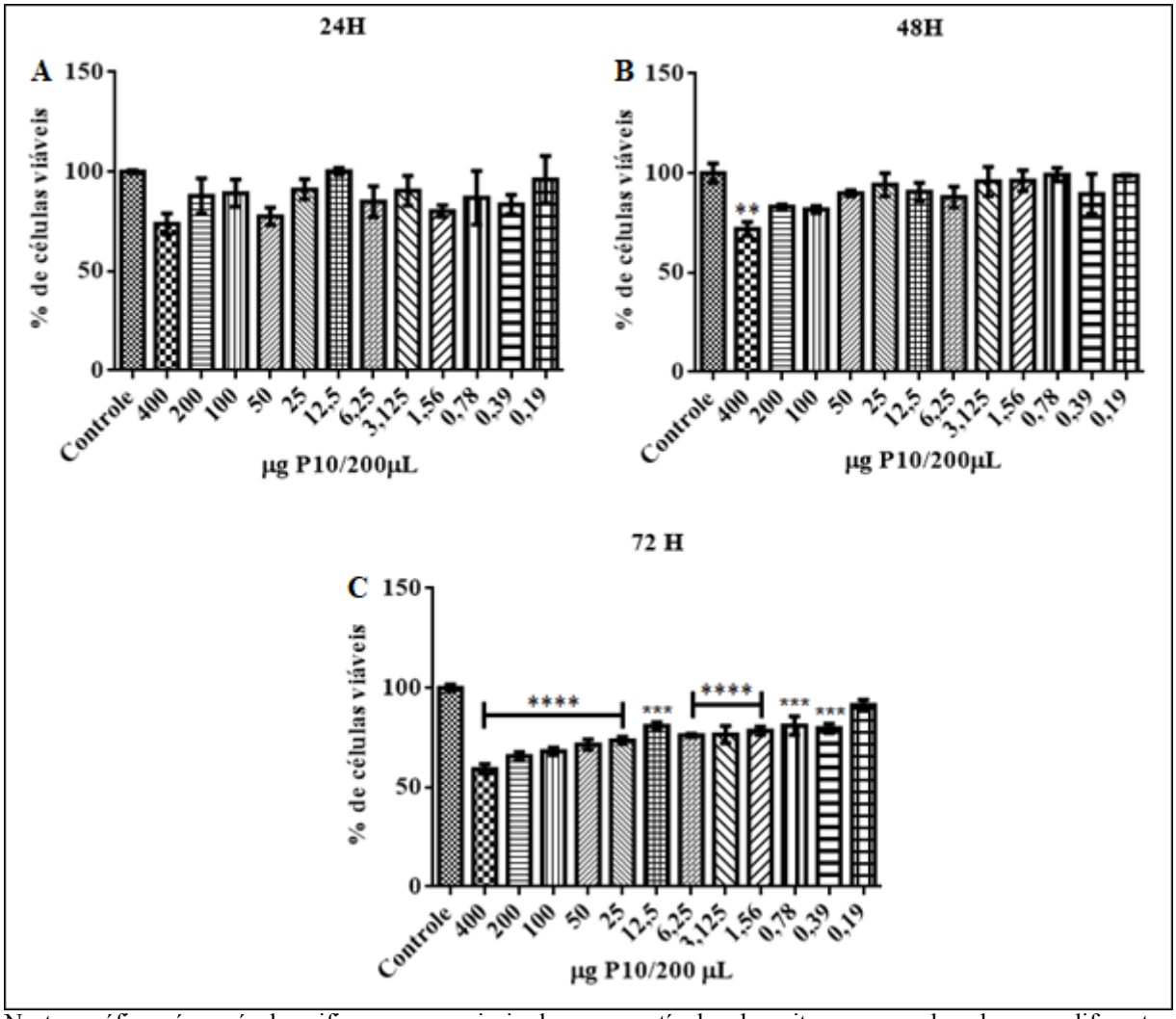
Figura 13. Toxicidade das nanopartículas de quitosana, vazias ou contendo diferentes concentrações de peptídeo P10, avaliada através de ensaio de hemólise em 2 e 6 horas. (A) Nanopartículas complexadas com peptídeo P10, (B) Nanopartículas vazias.



Nestes gráficos é possível verificar que as nanopartículas de quitosana vazias ou complexadas com o peptídeo P10 não apresentaram nenhum efeito hemolítico nos períodos de tempo analisados. As concentrações de peptídeo P10 complexado nas nanopartículas de quitosana variou de 3 mg/mL a 0 mg/ml. As concentrações de nanopartículas de quitosana vazias variaram de 1x a 0,015625x, sendo 1x a concentração pós preparação das nanopartículas, uma vez que não é possível quantificar as nanopartículas vazias. Foram usados como controles negativos (0% de hemólise) PBS 1x e como controle positivo (100% de hemólise) água destilada autoclavada.

Nos ensaios de citotoxicidade pelo método do MTT, verificou-se que nas primeiras 24 horas (Figura 14A) as nanopartículas complexadas com o peptídeo P10 não apresentaram nenhum tipo de citotoxicidade. No período de 48 horas (Figura 14B) somente a concentração mais alta, 400 μg, de peptídeo P10 apresentou citotoxicidade. Em 72 horas (Figura 14C) somente a menor concentração, 0,19 μg, de peptídeo P10 não apresentou citotoxicidade. Um novo ensaio é necessário para se verificar o que causou a morte dessas células, uma vez que em outros testes da mesma natureza realizados pelo grupo, não foi observado este tipo de resultado.

Figura 14. Citotoxicidade das nanopartículas de quitosana, contendo diferentes concentrações de peptídeo P10 avaliada em macrófagos da linhagem J774.16 com o auxílio do reagente MTT. (A) 24 Horas; (B) 72 Horas; (C) 96 Horas.



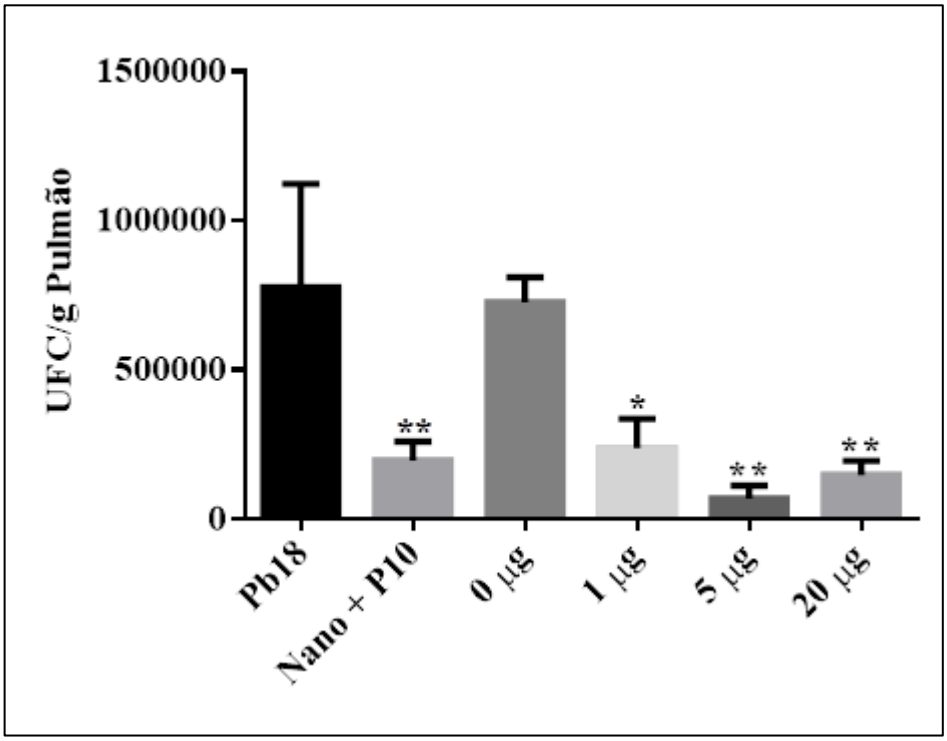
Nestes gráficos é possível verificar que a maioria das nanopartículas de quitosana complexadas com diferentes concentrações do peptídeo P10 apresentaram uma citotoxicidade relevante somente após 48 horas de contato com as células, com exceção das nanopartículas complexadas com 400 µg de peptídeo P10 que teve uma taxa de mortalidade celular abaixo de 35%. Com 72 horas quase todas as concentrações causaram algum grau de toxicidade celular, mas ainda assim mantendo uma taxa de viabilidade celular acima de 50%. A toxicidade deverá ser melhor analisada para a verificação de fatores de morte programada devido ao alto grau imunogênico do peptídeo P10. Foi utilizado como controle negativo o meio DMEM suplementado com SFB, sem a presença de nanopartículas. Teste estatístico ANOVA com $p \leq 0,05$ em comparação ao controle.

4.3 Carga fúngica

A eficácia do tratamento foi avaliada (Figura 15) após 51 dias de infecção (30 dias sem tratamento e 21 dias com tratamento) pela contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC). O tratamento com as nanopartículas se mostrou eficaz na redução da carga fúngica nas diferentes formas de aplicação das mesmas, tais como o peptídeo P10 livre em

associação com as nanopartículas vazias ou com o peptídeo em diferentes concentrações complexado nas nanopartículas, fazendo com que as nanopartículas liberassem de forma gradual e contínua o peptídeo P10 e ao mesmo tempo servissem como um adjuvante. Experimentos futuros esclarecerão se a utilização de nanopartículas de quitosana vazias em conjunto com diferentes concentrações do peptídeo P10 tem o mesmo efeito das nanopartículas complexadas com diferentes concentrações do peptídeo P10.

Figura 15. Carga fúngica presente nos pulmões de camundongos BALB/c após 51 dias de infecção com *P.brasiliensis*, avaliada através da contagem de UFC.



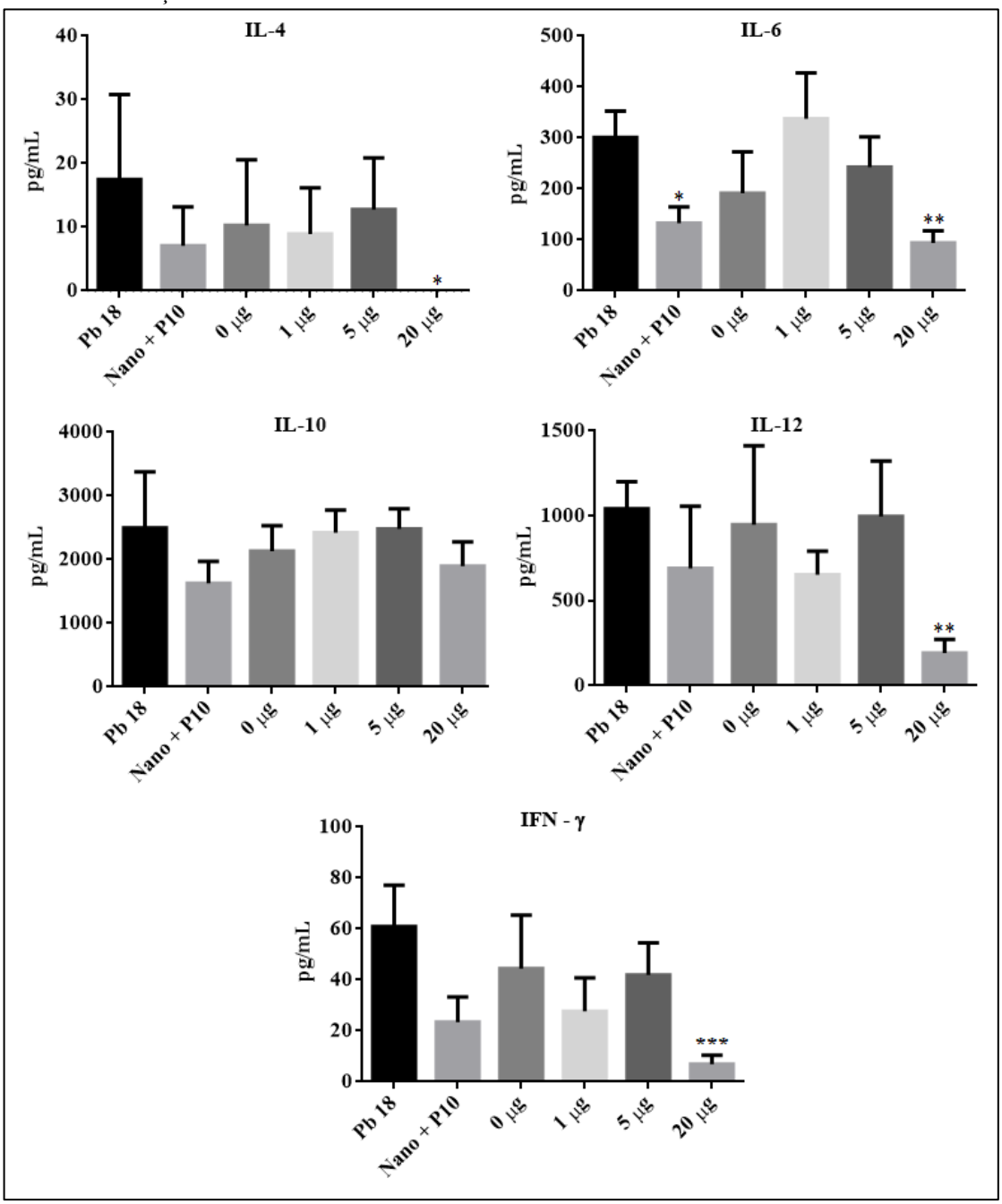
A partir da análise do gráfico da carga fúngica presente nos pulmões de camundongos após a eutanásia é possível verificar que o tratamento foi eficaz ao se utilizar a combinação entre as nanopartículas de quitosana com o peptídeo P10 (1 µg, 5 µg e 20 µg e Nano + P10. Além da redução da carga fúngica também é observada que as nanopartículas promovem a redução, de 4 a 20 vezes, da quantidade necessária de peptídeo para a modulação da resposta imune. Não foi apresentada diferença estatística quando se comparou os grupos Nano + P10, 1 µg, 5 µg e 20 µg. Teste estatístico ANOVA com $p \leq 0,05$ em comparação ao grupo infectado e não tratado (Pb 18).

4.4 Análise das citocinas presentes no pulmão

Após os 51 dias de infecção foi avaliado o perfil de citocinas quantificados a partir do macerado do pulmão de cada animal e de cada grupo de tratamento, para se avaliar qual o tipo de resposta imune, Th_1 por meio das citocinas IL-12 e IFN-γ ou Th_2 por meio das citocinas IL-4 e IL-6 além da citocina regulatória IL-10 foi gerado pelos tratamentos nos diferentes grupos.

Foi observado um perfil de citocinas de resposta mista, diferente do esperado quando se leva em conta o tipo de nanopartícula utilizado e a característica imunomoduladora do peptídeo P10.

Figura 16. Presença de citocinas anti e pró-inflamatórias nos macerados de pulmões de camundongos BALB/c após 51 dias de infecção com *P.brasiliensis.*

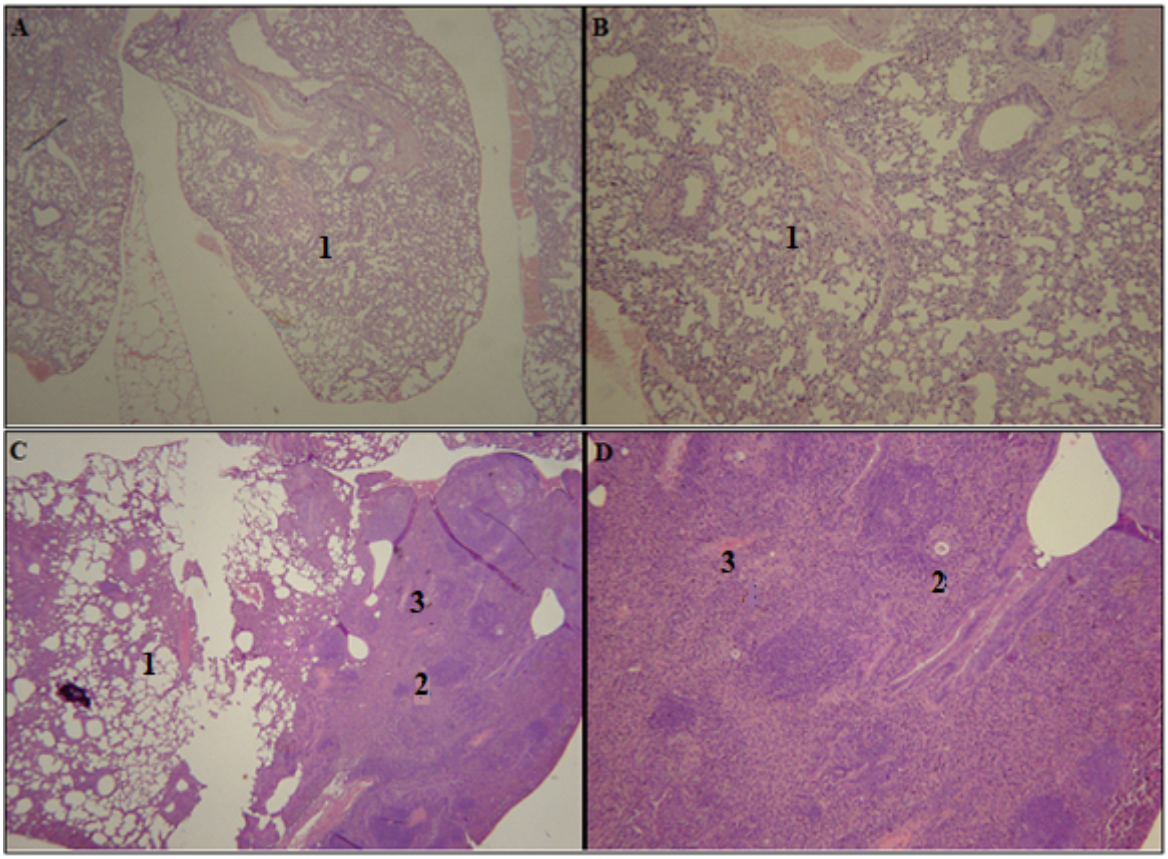


Após os 51 dias de infecção as citocinas apresentaram tendência de resposta imunológica mista, onde as citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias aparentam estar em equilíbrio quando comparadas com o grupo controle (Pb 18). Com exceção do grupo tratado com as nanopartículas complexadas com 20 µg do peptídeo P10, onde houve uma redução significativa das citocinas IL-4, IL-6, IL-12 e IFN-γ. Teste estatístico teste t $p \leq 0,05$ em comparação ao grupo infectado e não tratado (Pb 18).

4.5 Histologia do pulmão após o tratamento

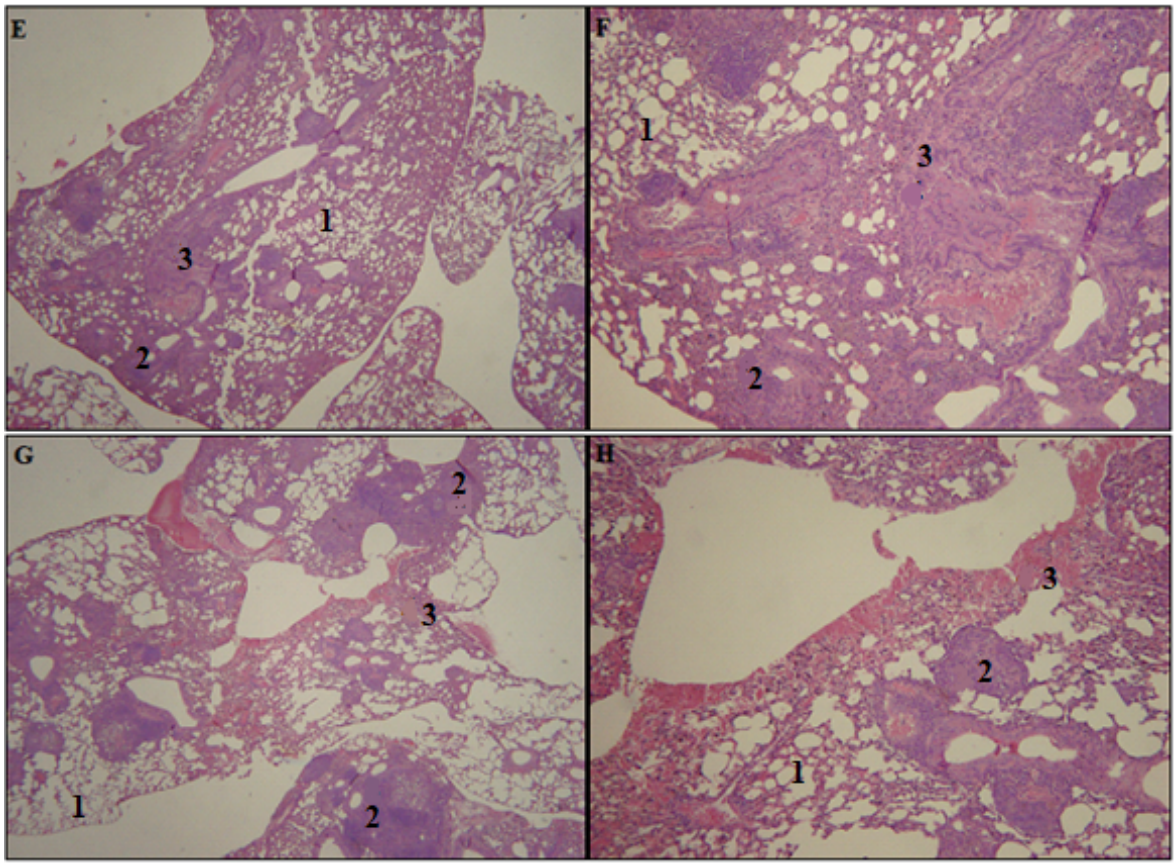
Após a 51 dias de infecção (considerando 30 dias sem tratamento e 21 dias com tratamento) é possível observar pela análise das estruturas celulares dos pulmões (Figuras 17 e 18), que nos grupos tratados com as nanopartículas com algum tipo de associação com o peptídeo P10 (1 µg, 5 µg e 20 µg e Nano + P10) a estrutura pulmonar está melhor preservada em relação ao grupo controle (Pb 18) mesmo com a presença de granulomas espalhados pelo tecido.

Figura 17. Histologia dos pulmões de camundongos BALB/c após 51 dias de infecção com *P.brasiliensis*.



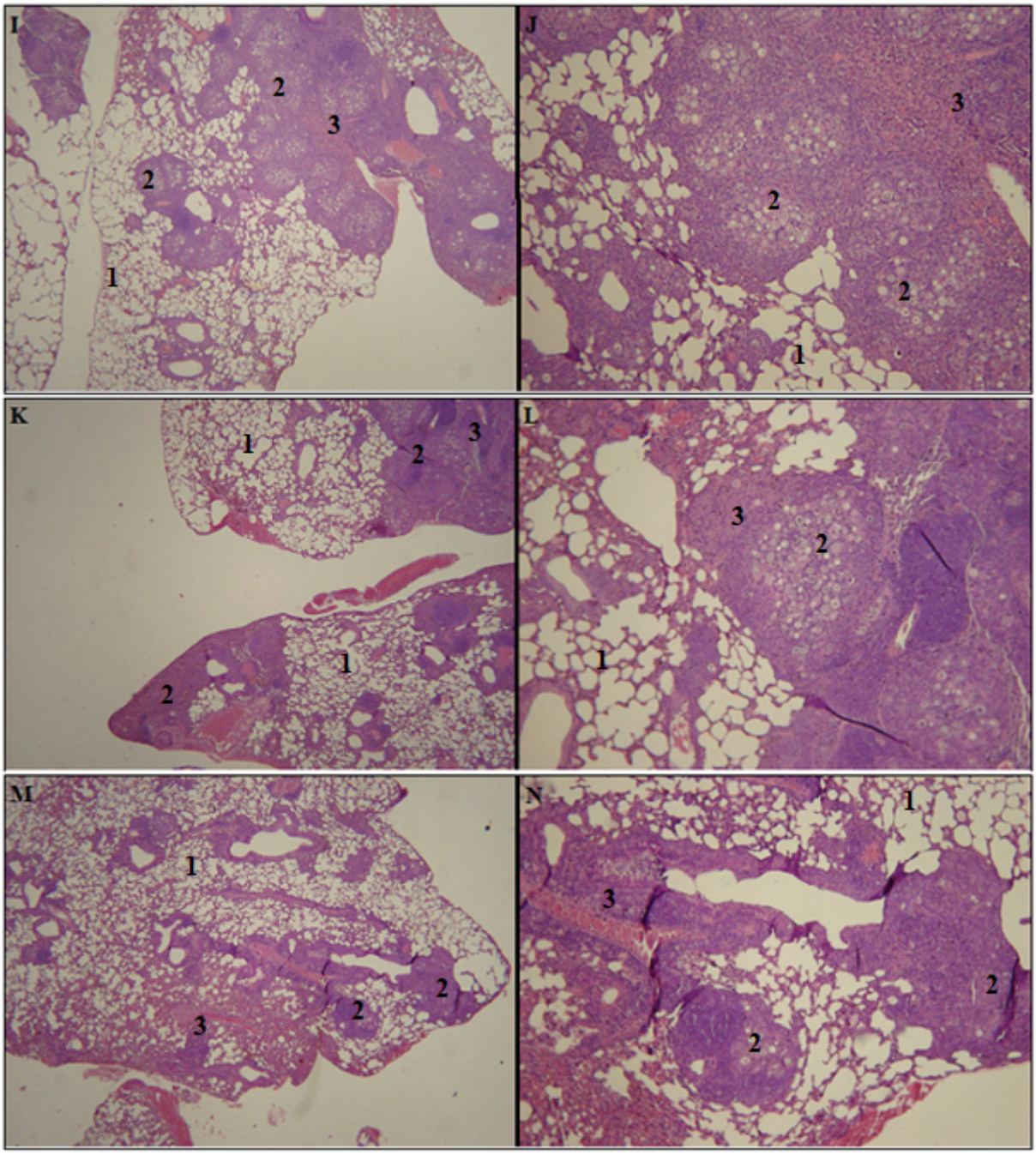
Histopatologia do pulmão de camundongos BALB/c em coloração HE após 51 dias de infecção com *P.brasiliensis*, onde é possível verificar: **(1)** tecido pulmonar preservado, **(2)** presença de granulomas frouxos, com presença do fungo (observado em aumento maior) e **(3)** presença de infiltrados inflamatórios. Figuras **A** e **B** representam os pulmões de camundongos **do grupo VII SHAM** (não infectado e não tratado) em aumento de 8x e 20x respectivamente. Figuras **C** e **D** representam os pulmões de camundongos do **grupo I Pb 18** (infectado e não tratado) em aumento de 8x e 20x respectivamente.

Figura 18. Histologia dos pulmões de camundongos BALB/c após 51 dias de infecção com *P.brasiliensis*.



Histopatologia do pulmão de camundongos BALB/c em coloração HE após 51 dias de infecção com *P.brasiliensis*, onde é possível verificar: **(1)** tecido pulmonar preservado, **(2)** presença de granulomas frouxos, com presença do fungo (observado em aumento maior) e **(3)** presença de infiltrados inflamatórios. Figuras **E** e **F** representam os pulmões de camundongos **do grupo II Nano + P10** (infectado e tratado com nanopartículas vazias e 20µg/10µL de peptídeo P10 livre) em aumento de 8x e 20x respectivamente. Figuras **G** e **H** representam os pulmões de camundongos do **grupo III 0 µg** (infectado e tratado com nanopartículas complexadas com 0 µg/10µL de peptídeo P10) em aumento de 8x e 20x respectivamente.

Figura 19. Histologia dos pulmões de camundongos BALB/c após 51 dias de infecção com *P.brasiliensis*.



Histopatologia do pulmão de camundongos BALB/c em coloração HE após 51 dias de infecção com *P.brasiliensis*, onde é possível verificar: **(1)** tecido pulmonar preservado, **(2)** a presença de granulomas bem definidos onde é possível ver a presença do fungo e **(3)** presença de infiltrados inflamatórios. Figuras **I** e **J** representam os pulmões de camundongos **do grupo IV - 1 µg** (infectado e tratado com nanopartículas complexadas com 1µg/10µL de peptídeo P10) em aumento de 8x e 20x respectivamente. Figuras **K** e **L** representam os pulmões de camundongos do **grupo V - 5µg/10µL** (infectado e tratado com nanopartículas complexadas com 5µg/10µL de peptídeo P10) em aumento de 8x e 20x respectivamente. Figuras **M** e **N** representam os pulmões de camundongos do **grupo VI - 20µg** (infectado e tratado com nanopartículas complexadas com 20µg/10µL de peptídeo P10) em aumento de 8x e 20x respectivamente.

.

5 DISCUSSÃO

Devido ao prolongado tempo de tratamento e ao contínuo acompanhamento médico, novas alternativas terapêuticas para tratar a PCM tornam-se desejáveis para melhorar tanto o quadro clínico como o bem-estar dos pacientes. Dentre estas novas alternativas para o tratamento da PCM, merece destaque a utilização do peptídeo P10 que demonstra promover expressiva capacidade de redução da carga fúngica em diferentes formas de aplicação no modelo experimental murino.

Apesar do peptídeo P10 representar um avanço no tratamento da PCM experimental, há ainda a necessidade de protegê-lo da degradação, sendo necessário estabelecer novas formas de utilizá-lo, tais como sua complexação em nanopartículas poliméricas feitas de PLGA ou quitosana.

Neste trabalho, o peptídeo P10 foi incorporado em nanopartículas de quitosana. O tamanho das partículas, seu PDI, potencial Zeta e eficiência de encapsulação estão de acordo com a literatura no que se diz respeito as nanopartículas preparadas a partir deste biopolímero (BERTHOLD; CREMER, 1996; MOHAMMADPOUR et al., 2012), sendo PDI menor que 0,5 indicando uma monodispersividade dos tamanhos das nanopartículas e o potencial Zeta positivo, permitindo uma maior interação com a membrana celular negativa (HE et al., 2010; MOHAMMADPOUR et al., 2012; MASARUDIN et al., 2015).

Em nossos resultados, a diferença entre os tamanhos das nanopartículas vazias e das nanopartículas complexadas com o peptídeo P10 podem ser explicadas devido a interação do peptídeo com a quitosana e com tripolifosfato (TPP) (BERTHOLD; CREMER, 1996).

O peptídeo P10 apresenta carga residual neutra e é hidrofóbico com capacidade de interagir tanto com as cargas negativas do TPP como as cargas positivas da quitosana, fazendo com que ele tenha a capacidade de se comprimir, fugindo da interação com o meio aquoso no

qual a nanopartícula é preparada. A mesma interação de cargas também explica a redução do potencial Zeta das nanopartículas complexadas (BERTHOLD; CREMER, 1996).

Os ensaios de hemólise corroboram com os dados da literatura que confirmam a biocompatibilidade das nanopartículas de quitosana contendo o peptídeo P10 (ILLUM et al., 2001; KEAN; THANOU, 2010; CASETTARI; ILLUM, 2014; XIA et al., 2015; CARROLL et al., 2016). Conforme esperado, as nanopartículas complexadas ou não com o peptídeo P10 não apresentaram potencial hemolítico indicando não serem capazes de desestabilizar as membranas das hemácias.

Nos ensaios de viabilidade de macrófagos pelo método do MTT observamos que a longo prazo (72h), ocorre citotoxicidade das nanopartículas complexadas com o peptídeo P10. Uma das possíveis explicações para a citotoxicidade é a presença do dimetilsufóxido, necessário para solubilização do P10, ou devido a toxicidade em si do peptídeo, já que o mesmo apresenta a característica de ser um forte imunomodulador (DE MELO et al., 2015).

A possibilidade da quitosana ter sido responsável pela morte das células ainda não pode ser descartada apesar de ser conhecida como biocompatível e não citotóxica (ILLUM et al., 2001; KEAN; THANOU, 2010; CASETTARI; ILLUM, 2014; XIA et al., 2015; CARROLL et al., 2016). Apesar destes resultados tóxicos, a segurança no seu uso pode ser assegurada pelos resultados do teste de hemólise.

A utilização das nanopartículas de quitosana complexadas ou coadministradas com o peptídeo P10 proporcionaram uma redução significativa não só da carga fúngica, como também da quantidade usual do peptídeo P10 para gerar uma resposta imune efetiva (TABORDA et al., 1998; AMARAL et al., 2010; TRAVASSOS; TABORDA, 2017).

Em estudos anteriores, nanopartículas de PLGA complexadas com o peptídeo P10 conseguiram reduzir a carga fúngica, utilizando-se apenas 25% do total de peptídeo testado para atingir resultados semelhantes àqueles publicados anteriormente. A diferença entre o ensaio

com PLGA e o atual (quitosana) está na forma de como foi administrada (intraperitoneal x intranasal) e o polímero utilizado (PLGA x quitosana) (AMARAL et al., 2010).

Além do peptídeo P10 outras moléculas imunomoduladoras também já foram associadas a nanopartículas para a produção de vacinas contra a PCM. Estudos utilizando uma vacina de DNA baseada na proteína de choque térmico de *Mycobacterium leprae* (HSP 65 do *inglês heat shock protein* 65) carregadas em nanopartículas de PLGA ou lipossomas, demonstraram novamente a redução da carga fúngica de *P. brasiliensis* e da quantidade da molécula imunomoduladora necessária para gerar uma resposta imunológica significativa (RIBEIRO et al., 2013).

Em ambos os casos, a utilização das nanopartículas de PLGA e ou lipossomas contendo o peptídeo P10 ou o a vacina de DNA (HSP 65 de *Mycobacterium leprae*), tiveram uma resposta imune com padrão Th_1 com o aumento da produção de citocinas dos tipos IL-12 e ou IFN-γ (AMARAL et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013).

A escolha da quitosana como polímero para a confecção das nanopartículas foi pensada com o objetivo de reduzir a necessidade de adjuvantes, pois a mesma já possui a capacidade de proteger o peptídeo P10 e promover a muco adesão das nanopartículas aumentado, assim, o tempo de contato das células com as nanopartículas (ILLUM; FARRAJ; DAVIS, 1994; VAN DER LUBBEN et al., 2001; VILA et al., 2004).

As nanopartículas de quitosana já foram utilizadas com sucesso contra outros tipos de fungos, tais como: *F. oxysporum* (DANANJAYA et al., 2017), *Nigrospora sphaerica*, *Botryosphaeria dothidea, Nigrospora oryzae* e *Alternaria tenuissima* (XING et al., 2016), *Pyricularia grisea* e *Alternaria solani* (SATHIYABAMA; PARTHASARATHY, 2016), provocando efeito fungicida e ou fungistático devido a modificações morfológicas nas paredes e membranas celulares.

A via intranasal foi escolhida, por ser uma via de fácil acesso, e que tem a característica de promover imunidade tanto local como sistêmica, apesar desta ser uma via conhecida pelas peptidases e proteases que acabariam por degradar o peptídeo P10 (IRWIN; HOLBROOK; DEY, 1995; HUSSAIN, 1998).

Esta via foi alvo de estudos, ao se buscar uma vacina eficaz contra a PCM, onde o peptídeo P10 foi administrado de forma profilática com a presença de adjuvantes, no caso a Flagelina de *Salmonella enterica* (Flic C) (BRAGA et al., 2009). A utilização desta formulação vacinal em esquema profilático de tratamento promoveu um contato prévio das células imunes com o peptídeo P10 e a Flic C, gerando memória contra o fungo, que promoveu uma resposta imune predominantemente do tipo Th_1 e a redução da carga fúngica após o desafio com *P. brasiliensis* (BERNSTEIN, 1992; KYD; FOXWELL; CRIPPS, 2001, BRAGA et al., 2009).

Em outro estudo utilizando a via de imunização intranasal para o tratamento da PCM experimental, empregou-se lipossomas carreando a vacina de DNA HSP 65 de *Mycobacterium leprae*, gerando resposta imune preferencial do tipo Th_1 e causou a redução da carga fúngica (RIBEIRO et al., 2013). As características físico-químicas do lipossoma promoveram o estimulo e resposta imunológica por meio da entrega do DNA diretamente no compartimento endossomal da célula fagocitária (RIBEIRO et al., 2013).

Ambos os estudos corroboram com os dados deste trabalho e demonstram que a via intranasal se apresenta como uma via alternativa e eficiente para a geração de resposta imune quando comparada as vias clássicas como a via intramuscular ou intraperitoneal (BRAGA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2013).

Sabe-se que o peptídeo P10 estimula um padrão de resposta imune predominante do tipo Th_1, pois o peptídeo induz a produção de citocinas como IL-12 e IFN-γ (TABORDA et al., 1998; TRAVASSOS; TABORDA, 2017). Esta modulação foi demonstrada em diversos estudos do nosso grupo de pesquisa, utilizando-se diferentes abordagens vacinais, variando

tanto as formulações da vacina quanto a forma de aplicação das mesmas (TRAVASSOS; TABORDA, 2017).

Neste estudo, os resultados indicam que a utilização de nanopartículas de quitosana, complexadas ou associadas com o peptídeo P10, promove uma resposta imune do tipo mista sem sobreposição das citocinas do tipo Th_1 ou Th_2. Diferentemente do encontrado nos trabalhos anteriores do grupo, onde ao se utilizar: nanopartículas de PLGA complexadas com o peptídeo P10 (AMARAL et al., 2010), peptídeo P10 em conjunto com a Flic C por via intranasal (BRAGA et al., 2009), integração do peptídeo P10 em particulas de tipo viral (VLP do ingles *virus like particles*) (HOLANDA et al., 2017), vacinas de DNA para expressão do peptídeo P10 (AMORIM et al., 2013), vacinas de DNA para expressão do peptídeo P10 e IL-12 (RITTNER et al., 2012), células dendriticas pulsadas com o peptídeo P10 (MAGALHÃES et al., 2012) e células dendriticas pulsadas com o peptídeo P10 em camundongos imunossuprimidos (SILVA et al., 2017), foi observado um padrão de resposta imune do tipo Th_1 com aumento das citocinas IL-2, IL-12 e IFN-γ e redução das citocinas como IL-4 e IL-10.

Análises de citocinas adicionais e outros testes devem ser realizados para se determinar o que levou a resposta tipo mista, já que a o peptídeo P10 tem a tendência de modular a resposta para o tipo Th_1 (TRAVASSOS; TABORDA, 2017) e as nanopartículas de quitosana podem apresentar ambas as modulações de resposta imune (Th_1 e Th_2) (READ et al., 2005; ZAHAROFF et al., 2008; WEN et al., 2011),

É possível observar na análise histológica dos pulmões dos animais infectados e vacinados uma maior preservação tecidual, devido principalmente ao equilíbrio das respostas Th_1 e Th_2 (DEPALO, 2000 DINARELLO, 2000; BLANCO; GARCIA, 2008; LEIBUNDGUT-LANDMANN; WÜTHRICH; HOHL, 2012; LIONAKIS; ILIEV; OPAL; STEELE; WORMLEY, 2012; HOHL, 2017).

Nossos resultados demonstram que a combinação de nanopartículas de quitosana mais peptídeo P10, imunizado pela via intranasal, reduz significativamente a carga fúngica nos pulmões dos camundongos infectados.

6 CONCLUSÃO

Por meio deste estudo foi possível concluir que:

- As nanopartículas de quitosana apresentaram características físico químicas ideais para objetivo do estudo.
- As nanopartículas de quitosana não apresentaram citotoxicidade relevante, permitindo assim seu uso nos testes de efetividade.
- As nanopartículas de quitosana apresentaram efeito adjuvante quando coadministradas com o peptídeo P10.
- As nanopartículas de quitosana permitiram a redução de 4 a 20 vezes na quantidade de peptídeo P10 necessária para a redução da carga fúngica em comparação com os ensaios de imunização do nosso grupo de pesquisa.
- O tratamento induziu uma resposta imune com produção de citocinas de padrão misto.
- A análise histológica dos pulmões dos animais infectados e imunizados com o peptídeo P10 complexado com quitosana revelaram estruturas mais preservadas, como o parênquima pulmonar, em relação aos controles.
- As nanopartículas de quitosana em conjunto com o peptídeo P10 foram capazes de promover a redução da carga fúngica pulmonar durante a infecção com leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*.

BIBLIOGRAFIA

AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. Preparation , characterization , and potential application of chitosan , chitosan derivatives , and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. **Drug design, development and therapy**, v. 10, p. 483–507, 2016.

AMARAL, A. C. et al. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 3, p. 526–533, 2009.

AMARAL, A. C. et al. Poly(lactic acid-glycolic acid) nanoparticles markedly improve immunological protection provided by peptide P10 against murine paracoccidioidomycosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 5, p. 1126–1132, 2010.

AMORIM, J. DE et al. DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis induces long-term protection in presence of regulatory T cells. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 3, p. 181–191, mar. 2013.

ARANTES, T. D. et al. Paracoccidioides brasiliensis AND Paracoccidioides lutzii, A SECRET LOVE AFFAIR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 1, p. 25–30, 2015.

ARANTES, T. D. et al. Environmental Mapping of Paracoccidioides spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–18, 2016.

ASSIS-MARQUES, M. A. et al. Saccharomyces cerevisiae Expressing Gp43 Protects Mice against Paracoccidioides brasiliensis Infection. **PLoS ONE**, p. 1–13, 2015.

BANO, I. et al. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 380–383, 2017.

BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de a-quitina e quitosanas de cascas de Macrobrachium rosembergii. **Quimica Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014–2019, 2008.

BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, p. 209–221, 2008.

BERNSTEIN, J. M. Mucosal Immunology of the Uper Respiratory Tract. **Respiration**, v. 59, p. 3–13, 1992.

BERTHOLD, A.; CREMER, K. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti- inflammatory drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 39, p. 17–25, 1996.

BHATTACHARYYA, D.; SINGH, S.; SATNALIKA, N. Nanotechnology , Big things from a Tiny World : a Review. **Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 29–38, 2009.

BLANCO, J. L.; GARCIA, M. E. Immune response to fungal infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, n. 1–2, p. 47–70, 2008.

BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1177–91, 2013.

BOLHASSANI, A. et al. Polymeric nanoparticles Potent vectors for vaccine delivery targeting cancer and infectious diseases. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 10, n. 2, p. 321–323, 2014.

BORGES, S. R. C. et al. Itraconazole vs. trimethoprim-sulfamethoxazole: A comparative cohort study of 200 patients with paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 52, n. 3, p. 303–310, 2014.

BRAGA, C. J. M. M. et al. Paracoccidioides brasiliensis vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the Salmonella enterica FliC flagellin. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 4, p. 1700–1707, 2009.

CALVO, P. et al. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 10, p. 1431–1436, 1997.

CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extraçâo, estruturas e propriedades de a- e b-quitina. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007.

CARCABOSO, A. M. et al. Potent, long lasting systemic antibody levels and mixed Th1/Th2 immune response after nasal immunization with malaria antigen loaded PLGA microparticles. **Vaccine**, v. 22, n. 11–12, p. 1423–1432, 2004.

CARROLL, E. C. et al. The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons Article The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interfero. **Immunity**, v. 44, p. 597–608, 2016.

CASETTARI, L.; ILLUM, L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 189–200, 2014.

COSTANTINO, H. R. et al. Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1–2, p. 1–24, 2007.

CSABA, N.; GARCIA-FUENTES, M.; ALONSO, M. J. Nanoparticles for nasal vaccination. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 2, p. 140–157, 2009.

DAI, T. et al. Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 9, n. 7, p. 857–879, 2011.

DANANJAYA, S. H. S. et al. Comparative study on antifungal activities of chitosan nanoparticles and chitosan silver nano composites against Fusarium oxysporum species complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 478–488, 2017.

DE MELO, F. M. et al. Anti-metastatic immunotherapy based on mucosal administration of flagellin and immunomodulatory P10. **Immunology and cell biology**, v. 93, n. 1, p. 86–98, 2015.

DE MELO TEIXEIRA, M. et al. Paracoccidioides lutzii sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, v. 52, n. June 2013, p. 19–28, 2014.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503–508, 2000.

DINIZ, S. N. et al. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from

Paracoccidioides brasiliensis. **Vaccine**, v. 22, p. 485–492, 2004.

EMERICH, D. F.; THANOS, C. G. Nanotechnology and medicine. **Expert opinion on biological therapy**, v. 3, n. 4, p. 655–663, 2003.

FAN, F. R.; TANG, W.; WANG, Z. L. Flexible Nanogenerators for Energy Harvesting and Self-Powered Electronics. **Advanced Materials**, v. 28, n. 22, p. 4283–4305, 2016.

FORTES, M. R. P. et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 516–524, 2011.

GARCIA-FUENTES, M.; ALONSO, M. J. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 496–504, 2012.

GEGEMBAUER, G. et al. Serology of Paracoccidioidomycosis Due to Paracoccidioides lutzii. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

HE, C. et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3657–3666, 2010.

HOLANDA, R. A. et al. Recombinant vaccines of a CD4+ T-cell epitope promote efficient control of Paracoccidioides brasiliensis burden by restraining primary organ infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005927, 22 set. 2017.

HUSSAIN, A. A. Intranasal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 29, p. 39–49, 1998.

ILLUM, L. et al. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 51, p. 81–96, 2001.

ILLUM, L. Nasal drug delivery - Possibilities, problems and solutions. **Journal of Controlled Release**, v. 87, n. 1–3, p. 187–198, 2003.

ILLUM, L.; FARRAJ, N. F.; DAVIS, S. S. Chitosan as a Novel Nasal Delivery System for Peptide Drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 8, p. 1186–1189, 1994.

IRWIN, W. J.; HOLBROOK, P. A.; DEY, M. J. The stability of peptides in nasal enzymic systems. **International Journal of Pharmaceutic**, v. 113, p. 25–37, 1995.

JESUS, S. et al. Immune response elicited by an intranasally delivered HBsAg low-dose adsorbed to poly-ε-caprolactone based nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 504, n. 1–2, p. 59–69, 2016.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation , biodistribution and toxicity of chitosan ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3–11, 2010.

KHALILI, I. et al. Evaluation of Immune Response Against Inactivated Avian Influenza (H9N2) Vaccine, by Using Chitosan Nanoparticles. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 10–14, 2015.

KYD, J. M.; FOXWELL, A. R.; CRIPPS, A. W. Mucosal immunity in the lung and upper airway. **Vaccine**, v. 19, p. 2527–2533, 2001.

LEBRE, F. et al. Intranasal Administration of Novel Chitosan Nanoparticle/DNA Complexes

Induces Antibody Response to Hepatitis B Surface Antigen in Mice. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 472–482, 2016.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; WÜTHRICH, M.; HOHL, T. M. Immunity to fungi. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 4, p. 449–458, 2012.

LIONAKIS, M. S.; ILIEV, I. D.; HOHL, T. M. Immunity against fungi. **JCI Insight**, v. 2, n. 11, p. 1–17, 2017.

MAGALHÃES, A. et al. Prophylactic and Therapeutic Vaccination Using Dendritic Cells Primed with Peptide 10 Derived from the 43-Kilodalton Glycoprotein of Paracoccidioides brasiliensis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 10, n. 1, p. 23–29, 2012.

MARQUES, A. F. et al. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of Paracoccidioides brasiliensis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2814–2819, 2006.

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

MARTTIN, E. et al. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 29, n. 1–2, p. 13–38, 1998.

MASARUDIN, M. J. et al. Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: Application to the passive encapsulation of [14C]-doxorubicin. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 8, p. 67–80, 2015.

MENDES, J. F. et al. Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by Paracoccidioides lutzii. **Mycoses**, n. November 2016, p. 1–5, 2017.

MINAKAWA, T. et al. Detection of Multiple Budding Yeast Cells and a Partial Sequence of 43-kDa Glycoprotein Coding Gene of Paracoccidioides brasiliensis from a Case of Lacaziosis in a Female Pacific White-Sided Dolphin (Lagenorhynchus obliquidens). **Mycopathologia**, v. 181, n. 7–8, p. 523–529, 2016.

MOHAMMADPOUR, D. N. et al. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system. v. 18, n. 1, p. 44–52, 2012.

MOREIRA, A. P. V. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 51, p. 11–24, 2008.

MUÑOZ, J. E. et al. Immunization with P10 Peptide Increases Specific Immunity and Protects Immunosuppressed BALB/c Mice Infected with Virulent Yeasts of Paracoccidioides brasiliensis. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 177–188, out. 2014.

MUZZARELLI, R. Chitins and Chitosans as Immunoadjuvants and Non-Allergenic Drug Carriers. **Marine Drugs**, v. 8, n. 2, p. 292–312, 21 fev. 2010.

MYGIND, N.; DAHL, R. Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 29, n. 1–2, p. 3–12, 1998.

NASCIMENTO, E. M. et al. Immunization with radioattenuated yeast cells of Paracoccidioides brasiliensis induces a long lasting protection in BALB / c mice. **Vaccine**, v. 25, p. 7893–7899, 2007.

NEVES, A. L. D. P. et al. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 445, n. 2014, p. 34–39, 2014.

NI MHURCHU, C. et al. The effect of the dietary supplement, Chitosan, on body weight: a randomised controlled trial in 250 overweight and obese adults. **International Journal of Obesity**, v. 28, n. 9, p. 1149–1156, 2004.

NI MHURCHU, C. et al. Effect of chitosan on weight loss in overweight and obese individuals: A systematic review of randomized controlled trials. **Obesity Reviews**, v. 6, n. 1, p. 35–42, 2005.

OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest**, v. 117, n. 4, p. 1162–1172, 2000.

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S. Paracoccidioidomicose – Revisão da Literatura. **Scientia Medica, Porto Alegre: PUCRS**, v. 15, n. 4, p. 274–278, 2005.

PAN, L. et al. Induction of mucosal immune responses and protection of cattle against direct-contact challenge by intranasal delivery with foot-and-mouth disease virus antigen mediated by nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 5603–5618, 2014.

PARISE-FORTES, M. R. et al. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. **British Journal of Dermatology**, v. 154, n. 4, p. 643–650, 2006.

PARK, S.; VOSGUERICHIAN, M.; BAO, Z. A review of fabrication and applications of carbon nanotube film-based flexible electronics. **Nanoscale**, v. 5, n. 5, p. 1727–1752, 2013.

PINTO, A. R. et al. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from Paracoccidioides brasiliensis. **Vaccine**, v. 18, p. 3050–3058, 2000.

RAJ, S. et al. Nanotechnology in cosmetiics: Opportunities and challenges. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 2, p. 1–10, 2015.

READ, R. C. et al. Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan. **Vaccine**, v. 23, n. 35, p. 4367–4374, 2005.

RESTREPO, A.; ARANGO, M. D. In vitro susceptibility testing of Paracoccidioides brasiliensis to sulfonamides. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 18, n. 1, p. 190–194, 1980.

RESTREPO, A.; GÓMEZ, B. L.; TOBÓN, A. Paracoccidioidomycosis: Latin America's own fungal disorder. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 4, p. 303–311, 2012.

REZENDE, S. et al. CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS Scheila. **Quimca Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

RIBEIRO, A. M. et al. DNAhsp65 vaccination induces protection in mice against

Paracoccidioides brasiliensis infection. **Vaccine**, v. 27, n. 4, p. 606–613, jan. 2009.

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

RIBEIRO, A. M. et al. Nanobiotechnological Approaches to Delivery of DNA Vaccine Against Fungal Infection. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 2, p. 221–230, 1 fev. 2013.

RITEAU, N.; SHER, A. Chitosan: An Adjuvant with an Unanticipated STING. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 522–524, 2016.

RITTNER, G. M. G. et al. Therapeutic DNA Vaccine Encoding Peptide P10 against Experimental Paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1519, 28 fev. 2012.

SACRISTÁN, C. ET AL. Lacaziosis-like disease in Tursiops truncates from Brazil: A histopathological and immunohistochemical approach. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 117, n. 3, p. 229–235, 2016.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20–31, 2007.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v. 40, n. 3, p. 225–242, 2002.

SATHIYABAMA, M.; PARTHASARATHY, R. Biological preparation of chitosan nanoparticles and its in vitro antifungal efficacy against some phytopathogenic fungi. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 321–325, 2016.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Consenso em paracoccidioidomicose Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715–740, 2017.

SILVA, L. B. R. et al. Dendritic Cells Primed with Paracoccidioides brasiliensis Peptide P10 Are Therapeutic in Immunosuppressed Mice with Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–10, jun. 2017.

SOUZA, A. C. O. et al. Activity and in vivo tracking of Amphotericin B loaded PLGA nanoparticles. **European journal of medicinal chemistry**, v. 95, p. 267–276, 2015.

SOUZA, A. C. O.; AMARAL, A. C. Antifungal Therapy for Systemic Mycosis and the Nanobiotechnology Era : Improving Efficacy , Biodistribution and Toxicity. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. March, p. 1–13, 2017.

STEELE, C.; WORMLEY, F. L. Immunology of fungal infections: Lessons learned from animal models. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 413–419, 2012.

TABORDA, C. P. et al. 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**, v. 66, n. 2, p. 786–793, 1998.

TEIXEIRA, M. M. et al. Paracoccidioides Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 4–7, 2014.

TERÇARIOLI, G. R. et al. Ecological study of Paracoccidioides brasiliensis in soil: Growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 1–8, 2007.

THOMAZ, L. et al. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 induce a protective immune response against experimental Paracoccidioides lutzii. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 9, p. 788–795, 2014.

TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. New advances in the development of a vaccine against paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JUN, p. 1–6, 2012.

TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Linear epitopes of Paracoccidioides brasiliensis and other fungal agents of human systemic mycoses as vaccine candidates. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAR, p. 1–11, 2017.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, n. April, p. 9–25, 2017.

VAN DER LUBBEN, I. M. et al. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 3, p. 201–207, 2001a.

VAN DER LUBBEN, I. M. et al. Chitosan for mucosal vaccination. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 2, p. 139–144, 2001b.

VASCONELOS, Y. Nanotecnologia: Múltiplas utilidades. **Pesquisa FAPESP**, v. 136, n. 72, 2007.

VILA, A. et al. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 123–131, 2004.

VILELA, R. et al. Cutaneous granulomas in dolphins caused by Novel uncultivated paracoccidioides brasiliensis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, p. 2063–2069, 2016.

WEN, Z. S. et al. Chitosan nanoparticles act as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice. **Marine Drugs**, v. 9, n. 6, p. 1038–1055, 2011.

XIA, Y. et al. Chitosan-based mucosal adjuvants : Sunrise on the ocean. **Vaccine**, v. 33, n. 44, p. 5997–6010, 2015.

XING, K. et al. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of oleoyl-chitosan nanoparticles against plant pathogenic fungi. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 830–836, jan. 2016.

ZAHAROFF, D. A. et al. Immune Responses To Subcutaneous Vaccination. v. 25, n. 11, p. 2085–2094, 2008.

ZENG, W. et al. Fiber-based wearable electronics: A review of materials, fabrication, devices,

and applications. **Advanced Materials**, v. 26, n. 31, p. 5310–5336, 2014.

ZHAO, K. et al. Chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles as an efficient delivery system for Newcastle disease virus DNA vaccine. **International journal of nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 4609–19, 2014.

LISTA DE REAGENTES

ANTICOAGULANTE (ACD)

REAGENTES	QUANTIDADES
Ácido cítrico	7,36 g
Citrato de sódio	14,71 g
Dextrose	9,91 g
Água miliQ	250 mL

Solução esterilizada por meio de filtração (filtro com poro de 0,22 μm)

TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO (PBS)

REAGENTES	PBS - 1x	PBS - 10x
NaCl	8 g	80 g
KCl	0,2 g	2 g
Na_2HPO_4	1,44 g	14,4 g
KH_2PO_4	0,24g	2,4 g
H_2O d q.s.p	1000 mL	1000 mL

Solução autoclavada a 120 °C por 20 minutos.

MEIO DE CULTURA FAVA-NETTO

REAGENTES	Líquido	Sólido
Protease peptona	3 g	3 g
Peptona	10 g	10 g
Extrato de carne	5 g	5 g
NaCl	5 g	5 g
Extrato de levedura	5 g	5 g
Dextrose	40 g	40 g
Agar	-	18 g
H_2O d q.s.p	1000 mL	1000 mL

Meio autoclavado a 120 °C por 20 minutos.

MEIO DE CULTURA BHI

REAGENTES	Líquido	Sólido
BHI Caldo	37 g	37 g
Agar	-	15 g
BHI Agar	-	-
H_2O d q.s.p	1000 mL	1000 mL
Glicose*	40 mg (4%)	40 mg (4%)
SFB*	40 mL (4%)	40 mL (4%)
FPb 192*#	-	50 mL (5%)

*Meio Suplementado; #Meio UFC. Meio autoclavado a 120 °C por 20 minutos.

MEIO DE CULTURA MMcM

REAGENTES	1000 mL
Glicose	10 g
KH_2PO_4	1,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g
$CaCl_2.2\ H_2O$	0,15 g
NH_4SO_4	2,0 g
L-asparagina	2,0 g
L-cistina#	2,0 g
Solução de vitaminas *	10 mL
Solução de traço de elemento*	1 mL
Água miliQ	989 mL

Solubilizado por agitação magnética em solução aquecida de HCl 10 M. O pH foi corrigido para pH 7,0 com NaOH 10 M e posteriormente autoclavado a 120 °C por 20 minutos. * Adicionados após esterilização do meio.

SOLUÇÃO DE VITAMINAS

REAGENTES	QUANTIDADES
Tiamina	6,0 mg
Niacina	6,0 mg
Pantotenato de Calcio	6,0 mg
Inositol	1,0 mg
Biotina	0,1 mg
Riboflavina	1,0 mg
Ácido Fólico	10 mg
Cloreto de colina	10 mg
Piridoxina	10 mg
Água miliQ q.s.p.	100 mL

Solução esterilizada por meio de filtração (filtro com poro de 0,22 μm)

SOLUÇÃO DE TRAÇO DE ELEMENTO

REAGENTES	QUANTIDADES
H_3BO_3	5,7 mg
$CuSO_4.H_2O$	15,7 mg
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2\ .\ 6H_2O$	140,4 mg
$MnSO_4\ .\ 14H_2O$	8,1 mg
$(NH_4)_6MO_7O_{24}\ .\ 4H_2O$	3,6 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	79,2 mg
Água miliQ	100 mL

Solução esterilizada por meio de filtração (filtro com poro de 0,22 μm)

ANEXO A – Certificado de realização do curso de treinamento em biossegurança.

Certificado

Certificamos que **Samuel Rodrigues dos Santos Junior** participou do Treinamento em Biossegurança realizado no Departamento de Microbiologia/ICB-USP, no dia 30 de novembro de 2016, com carga horária total de 6 horas.

Prof. Dr. Gabriel Padilla
Responsável pelo Treinamento

Veridiana Munford
Técnica Responsável pelo Treinamento

ANEXO B – Certificado de realização do curso de uso de animais em experimentação.

Uso de animais
para experimentação

ICB USP

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que

Samuel Rodrigues dos Santos Júnior

participou do Curso "Uso de Animais em Experimentação" com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 13 julho 2017
Comissão de Biotérios
ICB USP

Instituto de Ciências Biomédicas | USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 • Cidade Universitária "Armando Salles Oliveira" • Butantã – São Paulo – SP • CEP 05508-900

ANEXO C – Certificado de realização do curso de armazenamento, manuseio e descarte de produtos químicos.

Comissão de Resíduos QUÍMICOS

ICB USP

Declaro, para os devidos fins, que

Samuel Rodrigues dos Santos Júnior

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos", realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 13 julho 2017
(Declaração válida por 5 anos)

Helayne Freitas
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos

Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt
Diretor do ICB

Instituto de Ciências Biomédicas | USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 • Cidade Universitária "Armando Salles Oliveira" • Butantã – São Paulo – SP • CEP 05508-900