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
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 paracoccidiodomicose 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:

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
<i>Mus musculus</i>	<i>Balb-C</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>6-8 semanas/weeks</i>	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

Cidade Universitária "Amando de Oliveira", Butantã, São Paulo - SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone: (11) 3091-7133 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 PARACOCIDIOIDOMICOSE 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.

Prof. 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 paracoccidiodomicose. 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 paracoccidiodomicose em modelo murino.** 2018. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia) – Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A Paracoccidiodomicose (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 Th₁, produtora de IFN- γ , 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- γ production, 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.

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).

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

1.2 FUNGO

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. são classificados taxonomicamente como pertencentes ao filo *Ascomycota*, classe *Euscomycetes*, 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 espécies: *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 Th₁ 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 Th₂ 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 Th₁, 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 resposta Th₂, 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 Th₁ (TABORDA et al., 1998).

Ainda em modelo de PCM experimental, o peptídeo P10 foi capaz de induzir a geração de resposta imune do tipo Th₁, 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, demonstraram 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 Th₁. 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 possível verificar a redução da carga fúngica e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, sendo que os grupos tratados com as células dendríticas pulsadas com peptídeo P10 e o sulfametoxazol/trimetoprim apresentaram maiores índices 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 *virus like particles*), que são pequenas partículas carregadoras 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 carregadoras 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 Th₁.

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 carregada (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 carregamento 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 carregando 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.

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 rosenbergii. **Química 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. Extração, estruturas e propriedades de a- e b-quitina. **Química 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. *Paracoccidioidomycose*: 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 cosmetics: 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. **Quimica 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 truncatus 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.

VASCONCELOS, 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.

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.

Samuel Padilla

Prof. Dr. Gabriel Padilla
Responsável pelo Treinamento

Veridiana Munford

Veridiana Munford
Técnica Responsável pelo Treinamento

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

Uso de animais
para experimentação

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

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

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)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'H. Freitas', on a light blue rectangular background.

Helayne Freitas
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. C. Bitencourt', on a light blue rectangular background.

Prof. Dr. Jackson Cioni Bitencourt
Diretor do ICB