

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

**Estudo dos efeitos da terapia de scFv que mimetiza o  
antígeno gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* conjugado  
à nanocápsulas na paracoccidioidomicose experimental**

Roney Henrique Pereira

**São Paulo  
2015**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

Estudo dos efeitos da terapia de scFv que mimetiza o antígeno gp43  
de *Paracoccidioides brasiliensis* conjugado à nanocápsulas na  
paracoccidioidomicose experimental

Roney Henrique Pereira

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.  
Original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Profa. Dra Karen Spadari Ferreira

São Paulo

2015

Roney Henrique Pereira

Estudo dos efeitos da terapia de scFv que mimetiza o antígeno gp43  
de *Paracoccidioides brasiliensis* conjugado à nanocápsulas na  
paracoccidioidomicose experimental

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dra.  
Karen Spadari Ferreira

---

1o. examinador

---

2o. examinador

---

3o. examinador

---

4o. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

## RESUMO

Pereira, R. H. **Estudo dos efeitos da terapia de scFv que mimetiza o antígeno gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* conjugado à nanocápsulas na paracoccidioidomicose experimental.** 2015. f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, endêmica na América Latina, com alta prevalência no Brasil. O agente etiológico da doença são fungos do gênero *Paracoccidioides*. A gp43 é o antígeno principal do *Pb* e tem sido demonstrado que camundongos imunizados com anticorpos monoclonais anti-gp43 (MAbs) (Ab1) induzem a cascata idiotípica, produzindo anticorpos anti-Id (Ab2) e anti-anti-Id (Ab3). Observou-se que todos os Mabs Ab2 inibiram (>90%) a ligação da gp43 ao Mab 17c (Ab1) sugerindo que estes Mabs anti-Id ligam-se ao parátipo do Mab Ab1, comprovando assim que os Mabs anti-Id obtidos possuem a imagem interna da gp43. Então, nosso grupo de pesquisa construiu uma nova molécula de anticorpo à partir do Mab anti-idiotípico Ab2- $\beta$ , que mimetiza o antígeno gp43 de *P.brasiliensis*, denominada de fragmento variável de cadeia única (scFv), e a transfecção dessa molécula em células dendríticas (DCs) mostrou ser promissora na PCM experimental. Visto que a molécula de DC-pMAC/PS-scFv, que possui a região de reconhecimento e ativação de linfócitos T, mostrou eficiência em modelo murino de terapia na PCM experimental, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da terapia com o scFv em associação às nanocápsulas. Para isso, utilizando a levedura *Pichia pastoris*, obtivemos a expressão da molécula de scFv recombinante que foi posteriormente encapsulada em um composto a base de PLGA, na proporção 50:50 de PLA e PGA, e testada em modelo murino. Nosso modelo de terapia com scFv encapsulado mostrou-se eficiente, uma vez que observamos diminuição do CFU, maior recrutamento de células dendríticas e macrófagos nos pulmões dos animais, bem como aumento da produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-12, diminuição de IL-10 para os animais tratados com o scFv encapsulado. Para as citocinas IL-4 e IL-17, não obtivemos níveis diferentes entre os grupos de tratamento. Ainda, não observamos diferença na produção de imunoglobulina IgG1. Sendo assim, nossos resultados sugerem a modulação de resposta imune para o tipo Th1, importante na proteção da PCM e diminuição da carga fúngica pulmonar.

**Palavras-chaves:** Paracoccidioidomicose, nanocápsulas e scFv.

## Abstract

Pereira, R. H. **Study of the effects of the scFv therapy that mimics the Antigen of the conjugate *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 conjugated nanocapsules in Paracoccidioidomycosis.** 2015. f Dissertation (master in clinical analyses)- Faculty of pharmaceutical sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic Mycosis, endemic in Latin America, with high prevalence in Brazil. The Etiologic Agent of disease are fungus of the genus *Paracoccidioides*. The main Antigen is gp43 *Pb* and it has been shown that mice immunized with monoclonal anti-gp43 antibodies (MAbs) (Ab1) induce the all idiotypic, producing antibodies anti-Id (Ab2) and anti-anti-Id (Ab3). It was observed that all the Mabs Ab2 inhibited (90%) the > gp43 by Mab 17 c (Ab1) suggesting that these anti-Id Mabs bind to the Mab paratopo Ab1, proving how the anti-Id Mabs obtained possess the internal image of gp43 (GESZTESI *et al.*, 1996). So, our research group has built a new antibody molecule from Mab anti-idiotypic Ab2-b, which mimics the gp43 Antigen of *p. brasiliensis*, called single-chain variable fragment (scFv), and transfection of this molecule on dendritic cells (DCs) proved to be promising in the PCM. Since the molecule of DC-pMAC/PS-scFv, that has the recognition and activation of T lymphocytes, showed efficiency in murine model of therapy in experimental PCM, this study aimed to investigate the effects of therapy with the scFv in association to standard techniques. To do this, using the yeast *Pichia pastoris*, we obtained the expression of scFv recombinant molecule that was later encapsulated in the base compound of PLGA, 50:50 ratio of PLA and PGA, and tested in murine model. Our model of encapsulated scFv therapy proved to be efficient, since we observe reduction of CFU, greater recruitment of dendritic cells and macrophages in the lungs of animals, as well as increased production of cytokines such as IFN- $\gamma$  and IL-12, IL-10 reduction for animals treated with encapsulated scFv. For the cytokines IL-4 and IL-17, we didn't get different levels between treatment groups. Still, it was not observed decrease of IgG1 immunoglobulin. So, our results suggest the modulation of immune response to Th1 type, important in the protection of the PCM.

**Keywords:** Paracoccidioidomycosis, nanocapsules, and scFv.

# Agradecimentos

A Deus toda honra, louvor e glória.

Quando o Senhor me colocou na USP, pensei muito no que Ele queria me fazer aprender... Hoje, tenho certeza que cresei com homem, filho e profissional.

Obrigado Deus, por ter suprido cada necessidade minha em São Paulo... Pela força necessária para suportar as lutas, as dificuldades, a saudade... Mais do que nunca sei que "Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus".

Aos meus heróis... Pai e mãe. Eu consegui. Todas as ausências por estarem trabalhando para que eu pudesse estudar, todos os sonhos que vocês deixaram para trás para que eu pudesse alcançar os meus, todas as broncas, os castigos...E até os tapas serviram para que eu me tornasse um homem melhor. Um diploma é só uma gota d'água no oceano de todo ensinamento, todo amor...E tudo que vocês fizeram e fazem por mim até hoje. Mas, esse trabalho é a demonstração de que eu tentei, da melhor maneira possível, valorizar tudo isso! Vocês são meus heróis. Amo vocês.

A minha esposa, Thalita... Que mudou a minha vida a partir do momento que chegou. Obrigado pelo apoio, companhia, pelas noites perdidas me ajudando, pelas broncas para que eu pudesse crescer, aprender, valorizar cada minuto, cada momento de estudo...! Deus foi generoso ao me presentear com alguém como você. Te amo.

Aos meus irmãos Cris e Juninho. Por todo apoio.

A minha irmã Flávia, e meu cunhado Júnior. Palavras são efêmeras para traduzir o que vocês representam em minha vida. Minha gratidão será eterna. Obrigado pelos ensinamentos, pelas palavras de carinho, de apoio, preocupação... O meu eterno: muito obrigado.

Aos meus pais emprestados: Assunção e Carlão (in memoriam). Vocês foram minha segunda família. Como eu costumo dizer, minha mãe "preta", e meu "pai atleticano". Obrigado por toda dedicação, carinho, por ter me ensinado tanta coisa... Tenho orgulho de ter tido a presença de vocês em meu crescimento.

Aos meus professores: Tia Dorinha, Eliana, Tia Giselle, Lula, Anastázia, Rômulo, Luis Menini, João Vianna, Elba, Daniellê Chiellini, e tantos outros que passaram pela minha vida, nessa longa caminhada. Vocês foram mais que professores. Foram e são exemplos de conduta. De caráter. De profissionalismo. Se desejo a licenciatura como futuro, é por causa de vocês. Com vocês aprendi que vale a pena acreditar.

Ao meu eterno orientador, Alexander Quad... Você que me abriu a porta do primeiro estágio. Me ensinou o que era pesquisa. Me ensinou que mais vale uma correção em vermelho, do que nada aprender. Minha eterna gratidão.

Aos meus amigos de longa data: William Ignácio, Lézinho, Arthur, Hugo, Bruna, Djow... e toda a família Antônio Carlos. Vocês são especiais.

Aos amigos do Departamento de Análises Clínicas da FCFUSP...

A minha orientadora... Karen Spadari. Ah, como eu vou me lembrar de você! Enquanto escrevia estes agradecimentos, ouvi uma frase que me fez lembrar de você: "a fruta só dá o seu melhor quando esmagada". Durante esses quase 3 anos de convivência, tenho certeza que você sofreu comigo. Sei dos meus erros, e como já fiz tantas vezes, gostaria de me desculpar mais uma vez. Mas, saiba que aprendi imensamente com você. Não poderia ter tido alguém melhor para me cobrar, me fazer insistir, me ensinar... Obrigado por abrir as portas da USP, e por ter feito de mim um profissional melhor. Tudo isso, graças a ti. E toda sua insistência.

Ao Prof. Sandro Rogério de Almeida, por abrir as portas do laboratório, e com toda sua paciência, serenidade... Ter sido um exemplo. Obrigado pelas valiosas discussões e ensinamentos.

A Grasi Januzzi... que a cada dia veio tornando-se minha amiga, cúmplice dos fiascos... E que me ensinou quase tudo no laboratório. Obrigada por sua dedicação, pela ajuda nos experimentos, pelas dúvidas esclarecidas... Conte comigo. Sempre!

Agradeco em especial a Profa. Irênê Soares e Kátia Francoso, do Laboratório de Parasitologia... Parte deste trabalho só se deu graças a vocês, que gentilmente abriram as portas do laboratório, e me ajudaram a desenvolver este trabalho. De coração, agradeco!

A Nicolê Araújo, que foi meu braço direito neste trabalho. Aprendi imensamente com você.

Ào Zé... Sim Zé... Sua casa caiu! Obrigado por sua amizade durante esse tempo. Pelos ensinamentos valiosos...! E quando eu ver um jogo do Santos, vou me lembrar de você. Mas, Zico foi maior que Pelé.

À Suzlen dos Santos e ao Lucas Gonçalves pelas infinitas discussões, auxílio em técnicas...

À Fábio Szeiti, Gilberto Kaihama; pelo companheirismo, ensinamentos, broncas...

À Renata Albuquerque que sempre me auxiliou com o citômetro e compartilhou minha alegrias e frustrações com os resultados.

À Claudinha, Rose, e as “tias da limpeza”. Como era bom chegar e ouvir o “bom dia” de vocês. Sempre com um sorriso no rosto. Sempre dispostas a me ajudar, com uma palavra de apoio, de carinho... Lembrar-me sempre dos momentos de descontração, e das palavras que me levantavam. Vocês fazem parte disso.

À Edna, Suzli, Marilisa, Ana Dantas e principalmente o santista Iringu que sempre me auxiliaram em questões burocráticas relacionadas a este trabalho e pela paciência por todas as vezes que as procurei com algum problema ou dúvida.

À todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

À CAPES e a FAPESP pelo auxílio financeiro.



O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**μL** – Microlitro

**Ab2/Ab3** – Anticorpos anti-idiotípicos

**APC** – Células apresentadoras de antígeno

**BSA** – Albumina bovina sérica

**B7** – CD80/CD86

**BMMY** – “Buffered Complex Methanol Medium”

**BMGY** – “Buffered Complex Glycerol Medium”

**Ca<sup>2+</sup>** – Cálcio

**cAMP** – proteínas quinases dependentes do monofosfato cíclico de adenosina

**CBB** – “Coomassie Brilliant Blue”

**CCEA** - antígeno carcinoembriogênico humano

**cDCs** – Células dendríticas

**CDR** – “complementarity-determining regions”

**CEUA/FCF** – Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**CFA** – Antígeno livre da parede do fungo

**CFU** – Unidades formadoras de colônia

**ELISA** – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

**EBP** – “Estradiol binding protein”

**FACS** – Separação de Célula pela Atividade de Fluorescência

**Fc** – Fragmento cristalizável da molécula de imunoglobulina

**FDA** – “Food and Drug Administration”

**FITC** – Isotiocianato de Fluoresceína

**FMO** – “fluorescence-minus-one”

**FSc** – Tamanho relativo

**GM-CSF** – Fator de Crescimento Celular de Monócitos e Granulócitos

**Gp43** – Glicoproteína de 43 kDa

**GVHD** – “*Graft Versus Host Disease*”

**h** – Horas

**HIV** – Vírus da imunodeficiência humana

**Id** - Paratopo

**i.t.** – Intratraqueal

**ICAM** – Molécula de Adesão Intracelular

**IgG** - Imunoglobulina

**INF- $\gamma$**  – Interferon-gama

**IL**- Interleucina

**ITs** - sequências intragênicas

**kDa** – kiloDalton

**LPS** – Lipopolissacarídeo

**MAbs** – Anticorpos monoclonais

**MAPK** – “nitrogen activated protein kinase”

**Mb** – mega pares de bases

**MEC** – matrix extra celular

**MCMN** - Complexo metálico de nanocápsulas multiparedes

**MHC** –Complexo Principal de Histocompatibilidade

**mm** - milímetros

**MMTV** – vírus do tumor mamário murino

**mL** – Mililitro

**NO** – Oxído nítrico

**NK** – Natural Killer

**Pb** – *Paracoccidioides brasiliensis*

**PBS** – Solução Salina de Fosfato Tamponada

**PCM** – Paracoccidioidomicoses

**PCR** – “*Polymerase Chain Reaction*”

**PE** – “*Phicoeritrina*” (Ficoeritrina)

**PI** - Iodeto de propídeo

**pMAC/PS** – Vetor de célula de mamífero

**PMSF** - Inibidor de serino-protease

**PLGA** – ácido láctico-co-ácido glicólico

**PGA** – ácido glicólico

**PLA** – poli-ácido-láctico

**P10** – peptídeo 10

**RAPD** – “Random amplified polymorphic DNA”

**R10** – RPMI com 10% de SFB

**rpm** – Rotações por minuto

**RPMI** – Meio de cultura “Roswell Park Memorial Institute – 1640”

**RGD** – sequência peptídica formada por arginina, glicina e ácido aspártico

**scFv** - Fragmento variável de anticorpo de cadeia única

**SDS-PAGE** – Eletroforese em gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sódio

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**SNC** – Sistema nervoso central

**SPF** – Padrão sanitário livre de patógenos específicos

**TCR** – Receptor de Células T

**Th**- T Helper (Linfócito T auxiliar)

**TLR** – Receptores do tipo Toll

**TNF- $\alpha$**  – Fator alfa de necrose tumoral

**UFC** – unidades formadoras de colônia

**VH** – cadeia variável pesada de Anticorpo

## **FIGURAS**

- Figura 1** Representação esquemática da resposta imunológica que confere resistência à infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis*.....27
- Figura 2** Representação esquemática da resposta imunológica que confere suscetibilidade à infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis*.....29
- Figura 3** Esquema representativo de nanocápsula e nanoesfera.....36
- Figura 4** Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando as transformações do Plasmídeo e do vetor.....48
- Figura 5** Gel de agarose contendo as bandas da digestão plasmidial e do scFv.....49
- Figura 6** Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a digestão em larga escala do pPIgLE-scFv.....50
- Figura 7** Perfil eletroforético do scFv analisadas por SDS-PAGE 10%.....51
- Figura 8** Análise do gel 1 de SDS-PAGE do sobrenadante de cultura das amostras de expressão com 24h,48h,72h e 96h de indução.....52
- Figura 9** Purificação do scFv pelo método de cromatografia por afinidade.....52
- Figura 10** Imunização com scFv confere proteção em modelo de Paracoccidioidomicose.....54

<b>Figura 11a, b</b> Terapia com scFv encapsulado aumenta população de DCs CD11c e Macrófagos F4/80 nos pulmões.....	55
<b>Figura 11c</b> Terapia com scFv encapsulado aumenta população de DCs CD11c e Macrófagos F4/80 nos pulmões.....	56
<b>Figura 12a</b> Terapia com scFv encapsulado modula produção de citocina IFN – $\gamma$ .....	57
<b>Figura 12b</b> Terapia com scFv encapsulado modula produção de citocina IL-12.....	57
<b>Figura 12c</b> Terapia com scFv encapsulado modula produção de citocina IL-10.....	57
<b>Figura 12d</b> Terapia com scFv encapsulado modula produção de citocina IL-4.....	57
<b>Figura 12e</b> Terapia com scFv encapsulado modula produção de citocina IL-17.....	57
<b>Figura 13</b> Produção de IgG1.....	57
<b>Figura 14</b> Produção de isótipo IgG2a.....	59

# **Sumário**

1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1 Paracoccidiodomicose.....	18
1.2 Resposta imune frente à PCM.....	23
2 OBJETIVOS.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
3.1 Animais .....	39
3.2 Fungos .....	39
3.3 Infecção intratraqueal.....	39
3.4 Linhagem bacteriana .....	39
3.5 Plasmídeos .....	40
3.6 Transformação do pMAC/PS-scFv e pPIgLE para amplificação do produto por choque térmico .....	40
3.7 Extração do DNA por Miniprep .....	40
3.8 Obtenção do scFv e do vetor pPIgLE .....	41
3.9 Eluição dos fragmentos de DNA digeridos .....	41
3.10 Ligação dos fragmentos de DNA digeridos .....	41
3.11 Levedura <i>Pichia pastoris</i> .....	41
3.12 Preparo de células competentes de <i>P. pastoris</i> .....	42
3.13 Transformação e expressão do scFv .....	42
3.14 Análise da expressão do scFv .....	43
3.15 Purificação da proteína recombinante.....	43
3.16 Quantificação da proteína scFv recombinante por Bradford .....	44
3.17 Produção das nanocápsulas .....	44
3.18 Terapia de camundongos infectados com cepa virulenta do <i>Pb18</i> .....	44
3.19 Unidade formadora de colônia (UFC) .....	45
3.20 Perfil de células ativadas no pulmão de camundongos infectados e tratados com scFv conjugados à nanocápsulas .....	45
3.21 Dosagem de citocinas .....	46
3.22 Preparação do Antígeno livre da parede do Fungo (CFA).....	46
3.23 Dosagem de Imunoglobulinas (IgG).....	46
3.24 Análise estatística .....	47
4 RESULTADOS.....	48
4.1 Transformação do pMAC/PS-scFv e do plasmídeo pPIgLE Z22 em bactéria <i>E.coli</i> Competentes.....	48
4.2 Transformação e digestão do plasmídeo pPIgLE e do pMAC/PS-scFv. ....	48
4.3 Digestão em pequena e larga escala do pPIgLE. ....	49
4.4 Perfil eletroforético do scFv recombinante.....	50



4.5 Eletroporação e expressão do scFv em gel de poliacrilamida .....	51
4.6 Purificação da proteína scFv recombinante .....	52
4.7 Unidade Formadora de Colônias .....	53
4.8 Perfil de Células ativadas no Pulmão.....	54
4.9 Perfil de citocinas.....	56
4.10 Dosagem de imunoglobulinas.....	58
5 Discussão .....	60
6 <u>CONCLUSÃO</u> .....	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 – Paracoccidioidomicose**

As infecções fúngicas têm despertado atenção crescente da comunidade científica. As mortes, no Brasil, causadas por doenças tais como Paracoccidioidomicose (PCM), Criptococose, Histoplasmose, Candidíase, Aspergilose, Coccidioidomicose e Zigomicose atingiram um número de 3.583 entre 1996-2006. Dentre estas, a PCM possui papel de destaque por ser responsável por 51,2% dos casos, de acordo com Prado *et al.* (2009).

A PCM compromete primariamente o tecido pulmonar, tendo como possibilidade, atingir o sistema linfático, o tecido mucocutânea e, por proximidade, qualquer outro órgão, demonstrando portanto, que seu agente etiológico, o fungo do gênero *Paracoccidioides* deve ter desenvolvido, através da síntese de várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasito-hospedeiro, mecanismos de aderência e invasão que o capacitam extravasar barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (LENZI *et al.*, 2000).

Adolfo Lutz, em 1908, através de estudos de caso em pacientes que apresentavam granulomas ganglionares e lesões na mucosa oral, descreveu pela primeira vez o isolamento do agente etiológico da “hifoblastomicose pseudococcídica”. Para reforçar as diferenças existentes entre o fungo recém isolado e o agente causador da coccidioidomicose, também uma “hifoblastomicose”, que designava todas as doenças causadas por fungo dimórfico, foi usado o termo “pseudococcídica”. Posteriormente, em 1912, Splendore documentou em seu trabalho quatro novos casos de PCM, e após o isolamento do agente etiológico, o denominou de *Zymonema brasiliensis*. Inúmeras tentativas de classificação deste fungo foram feitas até 1930, quando Floriano de Almeida caracterizou este fungo emergente e o denominou de *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*). Sendo a doença por ele causada oficialmente denominada de PCM em 1971, durante o primeiro simpósio sobre este tema, sediada na cidade de Medellín, na Colômbia (LACAZ, 1994).

A partir de 1995, iniciaram-se estudos com o uso de RAPD para análise da variabilidade genética de *Pb* (SOARES *et al.*, 1995; MOLINARI-MADLUN *et al.*, 1999; HAHN *et al.*, 2002; HAHN *et al.*, 2003), RFLP (NINO-VEGA *et al.*, 2000), cariotipagem (MONTROYA *et al.*, 1997; CANO *et al.*, 1998; MONTROYA *et al.*, 1999) e microssatélites (NASCIMENTO *et al.*, 2004). Todos esses trabalhos demonstraram que há, entre os diferentes isolados deste fungo, uma grande variabilidade genética e alguns sugerem que os grupos

geneticamente isolados tenham diferenças em relação à virulência (MOLINARI-MADLUN *et al.*, 1999), resistência a drogas (HAHN *et al.*, 2003) e correlação com origem geográfica (CALCAGNO *et al.*, 1998; NINO-VEGA *et al.*, 2000).

Além de observarem uma extensa variabilidade genética dentre os isolados do patógeno, através de análises de polimorfismos de sequências gênicas, em 2006, Matute *et al.*, classificaram 65 isolados de *Pb* de acordo com os tipos moleculares em três diferentes espécies filogenéticas: S1, PS2 e PS3. Sendo a espécie S1, um grupo parafilético encontrado no Brasil, Paraguai, Argentina, Venezuela e Peru, e a espécie PS3 um grupo monofilético encontrado apenas na Colômbia. Com base na comparação de sequências codantes e não codantes de diferentes genes, além de regiões de sequência intragênica (ITS), de 21 isolados, sendo estes, 7 novos isolados, Carrero *et al.* (2008), classificaram-os dentro de duas espécies filogenéticas: S1 e PS2, além de classificar o isolado *Pb01* separado dos demais, propondo a classificação deste isolado como uma nova espécie filogenética. Em 2009, Teixeira *et al.*, ao analisar 88 isolados, identificaram 17 como pertencentes ao grupo *Pb01*-like. O mesmo grupo, através de análises de recombinação sugeriram a existência de isolamento reprodutivo, considerado assim os isolados *Pb01*-like como uma nova espécie, denominada *Paracoccidioides lutzii*.

Dentro desse quadro de diferentes isolados para o gênero *Paracoccidioides*, a espécie mais estudada é a *Paracoccidioides brasiliensis*.

O *Pb* é um fungo dimórfico térmico que, ao ser cultivado à temperatura ambiente entre 25°C e 27°C, apresenta-se sob forma de micélio, com colônias cotonosas, de crescimento lento e, microscopicamente apresenta, hifas hialinas septadas e delgadas. À 35°C – 37°C, possui forma leveduriforme, tendo sua colônia um aspecto cerebriforme, e microscopicamente apresenta células arredondadas ou ovaladas, de dupla parede refringente, multibrotamentos, com aspecto morfológico característico de “roda de leme” e diâmetro variável entre 5-30 µm (LACAZ *et al.*, 1991).

Embora os isolados de *Pb* tenham sido advindos ocasionalmente do solo, seu habitat ainda não foi determinado precisamente (VERGARA *et al.*, 1998), e esforços têm sido feitos para determinar seu micro-nicho, analisando assim, condições geoclimáticas das regiões onde fora encontrado o fungo. Estudos feitos por Borelli (1961), Restrepo e Espinal (1968) determinaram que o habitat do fungo prevalece em áreas de temperaturas amenas, entre 17°C e 27°C, clima úmido com pluviosidade de 1750-2500 mm, a existência de cursos de água e vegetação abundante. Outras circunstâncias, tais como a atividade econômica local, bem como

a exploração da terra e a respectiva devastação da vegetação nativa vem sendo associadas ao aparecimento do fungo (RESTREPO, 1985; MANGIATERRA *et al.*, 1999).

Em 2007, Terçarioli e colaboradores (2007), realizaram estudos envolvendo o cultivo de vários isolados de *Pb* em diferentes tipos de solo e demonstraram que o fungo apresenta capacidade de crescimento em solos argilosos e arenosos com alta umidade, podendo ser observado, em alguns isolados, inclusive a produção de conídios. Poucos estudos a respeito do isolamento feitos a partir de amostras de solo de diferentes locais como Brasil (SHOME; BATISTA, 1963; MONTENEGRO, *et al.*, 1996; VERGARA, *et al.*, 1998), Venezuela (ALBORNOZ, 1971) e Argentina (NEGRONI, 1976), tem sustentado a hipótese do solo ser o habitat natural do fungo. Porém, existem registros em outros materiais, como ração para cachorro provavelmente contaminada com o solo (FERREIRA *et al.*, 1990), vísceras de morcego *Artibeus lituratus* (GROSE; TAMSITT, 1965), fezes de pingüins (GEZUELE, 1989) e vísceras de tatus *Dasybus novemcictus* (BAGAGLI, 1998; VERGARA, *et al.*, 2000), e sua alta reatividade em testes cutâneos com a paracoccidioidina em trabalhadores agrícolas sustentam a tese do solo como fonte de infecção (RESTREPO *et al.*, 2001).

Em 2005, Theodoro *et al.*, sugeriram que alguns diferentes tipos de solos devem ser mais favoráveis à produção de conídios, sendo este um aspecto importante para a capacidade de infectar humanos bem como por aumentar a eficiência de sobrevivência do microrganismo junto ao meio ambiente. Fomentando essa hipótese os resultados de Franco *et al.* (2000) corroboram com essa hipótese por demonstrarem que diferentes condições de solo alteram a capacidade de crescimento da forma miceliana e a produção de conídios.

A capacidade de permanecer em latência durante longos períodos no hospedeiro tem sido uma lacuna a dificultar a investigação do micro-nicho do *Pb* (FRANCO *et al.*, 1989; LACAZ *et al.*, 2002; RESTREPO *et al.*, 2008).

Geograficamente a PCM está distribuída nos países da América Latina (FRANCO, *et al.*, 1987), como Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. Dados de Mc Ewen *et al.* (1995), estima-se que mais de 10 milhões de pessoas estejam infectadas com o fungo, entretanto, apenas 2% o desenvolvam na forma sintomática. O Brasil possui o maior número de pacientes notificados, com 80% dos casos (COUTINHO *et al.*, 2002), seguido pela Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina, porém com taxas de prevalência muito inferiores quando comparada aos países citados (BONIFAZ, 2010; BRUMMER *et al.*, 1993; NUCCI, 2009).

Embora considerada a terceira maior causadora de morte entre as doenças infecciosas crônicas, segundo Wanke e Aidê (2009), a PCM não é uma doença de notificação compulsória ([http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/anexo/anexo\\_prt1271\\_06\\_06\\_2014.pdf](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/anexo/anexo_prt1271_06_06_2014.pdf)) e,

dessa forma, não se pode calcular ao certo a taxa de incidência e prevalência da doença. Contudo, no Brasil, dados de Shikanai e Yasuda (2006), estimam que a taxa anual de incidência seja de 1-3 por 100 000 habitantes e a taxa de mortalidade média de 0,14 por 100 000 habitantes.

Durante quase duas décadas, entre os anos de 1980 e 1995, segundo o Ministério da Saúde ocorreram, no Brasil, cerca de 3.181 casos de óbito, totalizando assim uma taxa de mortalidade por PCM de 1,45 casos por milhão de habitantes, tornando assim, essa micose como a oitava causa de mortalidade por doenças infecciosas, e, conseqüentemente em um importante problema de saúde pública devido ao seu alto potencial incapacitante e à quantidade de mortes prematuras as quais provoca (SHIKANAI; YASUDA *et al.*, 2006). Sua alta taxa de mortalidade diminui não somente a qualidade, mas também o tempo de vida de indivíduos em idade produtiva, sendo, portanto, também um problema de importância social e econômica (SHIKANAI; YASUDA *et al.*, 2006), o que impulsiona pesquisas que buscam elucidar a biologia do fungo e da doença, e que apontem alternativas terapêuticas.

A incidência da PCM é maior em homens do que em mulheres, chegando a proporção de 13 homens para 1 mulher em áreas endêmicas, de acordo com Lacaz (1994). Entretanto, essa proporção não possui relação com o nível de exposição dos mesmos, uma vez que estudos tem demonstrado o mesmo grau de contato com o patógeno. Diversos estudos sugerem que essa discrepância possa ser justificada pela presença do estrógeno, hormônio feminino, que afeta a interação inicial parasita-hospedeiro suprimindo a conversão da forma miceliana (forma infectante do fungo) para a leveduriforme (forma parasitária) (RESTREPO *et al.*, 1984; SALAZAR *et al.*, 1988; ARISTIZABAL *et al.*, 1998).

Uma vez que o fungo penetra no organismo, ela pode ser completamente destruído ou então persistir, multiplicando-se e, levando a conseqüente lesão tecidual. Essa evolução e as conseqüências da infecção dependerão da interação de fatores como virulência e composição antigênica, sendo estes relacionados ao fungo; e fatores intrínsecos ao hospedeiro, tais como as características genéticas, a imunidade e o meio ambiente ao qual está inserido (CALICH *et al.*, 1985 e 1987).

A partir do momento que o hospedeiro demonstra ser incapaz de inibir o crescimento do fungo ao se contaminar, a micose se dissemina através da via linfática-hematogênica, trazendo consigo a progressão da doença com aparecimento de diversos sinais e sintomas. Estas manifestações clínicas tendem a diferenciar e direcionar a doença em duas formas: a PCM-infecção e a PCM – doença.

A PCM infecção caracteriza-se pelo desenvolvimento de uma resposta imune específica, evidenciada pela reação tardia do teste intradérmico com paracoccidioidina, embora haja ausência de sinais e sintomas, (LACAZ *et al.*, 1959). Por sua vez, na PCM-doença, o hospedeiro não possui capacidade de conter o crescimento do fúngico, dando início, portanto, ao processo de disseminação, e diversos sinais e sintomas que reúnem condições para subdividi-la em dois padrões distintos: i) a forma aguda/subaguda (tipo juvenil), que tem como característica ser a forma mais agressiva da doença; ii) a forma crônica tem desenvolvimento progressivo e lento (BLOTTA *et al.*, 1999; RICHINI; PEREIRA, 2009).

A forma aguda representa uma parcela pequena dos acometidos, cerca de 3%, e ocorre principalmente em crianças. Caracteriza-se por um desenvolvimento rápido da infecção, podendo variar de semanas a meses. É marcada pela hipertrofia do sistema reticuloendotelial, disfunção da medula óssea vermelha, resultando frequentemente em uma desordem linfoproliferativa. Todos estes requisitos a tornam a forma mais severa, com alta taxa de mortalidade (CAMARGO; FRANCO, 2000). É possível também observar lesões na pele, na região da face, perioral, pescoço, tronco, ou sobre a genitália masculina, podendo estas lesões serem ulceradas ou nodulares, e em caso de disseminação extensiva apresentarem forma papular ou acneiforme (BLOTTA *et al.*, 1999; LONDERO *et al.*, 1990; PEREIRA *et al.*, 2004). A resposta imune celular geralmente é deprimida, embora ocorra aumento da produção de anticorpos específicos.

Em contrapartida, a forma crônica ou adulta acomete cerca de 90% dos pacientes, e atinge principalmente adultos, sendo observada em pacientes por volta de 35 a 60 anos de idade, com prevalência no sexo masculino (RESTREPO *et al.*, 2008). Sua progressão é lenta, podendo levar anos ou décadas para tornar-se totalmente estabelecida. Atinge primariamente os pulmões, e, em 25% dos casos restringem-se a este órgão, provocando a aparição de sequelas de natureza fibrótica, podendo comprometer o funcionamento adequado do mesmo. A doença pode também disseminar para outros órgãos e formar lesões secundárias em mucosas, pele, linfonodos e glândulas adrenais (ABAD *et al.*, 1986; LONDERO; RAMOS, 1990).

A forma progressiva/crônica apresenta danos nos pulmões dos pacientes, podendo ou não estar associada a lesões extrapulmonares. Uma classificação antiga subdivide estes sintomas na forma de lesões unifocal ou multifocal (LACAZ *et al.*, 2002; LONDERO *et al.*, 1990). Entretanto, estudos de imagens feitos por Restrepo e colaboradores (2008), demonstraram que a PCM é uma micose multifocal independente de apresentar ou não sintomas em apenas um órgão, e apesar da predominância das lesões pulmonares, os sintomas

respiratórios são mínimos, presentes em apenas 11% dos casos. Os sintomas respiratórios, neste caso, são caracterizados pela tosse produtiva com presença de sangue no escarro e dispneia, podendo evoluir para insuficiência respiratória grave, infiltrados alveolares e intersticiais e lesões fibronodulares que persistem mesmo após o tratamento do fungo (AGUIAR, 2003; RESTREPO *et al.*, 2008).

O diagnóstico da PCM é realizado através de métodos diretos, tais como os exames microscópicos de espécimes biológicos do paciente, como pus, escarro, biópsia, cultivo em meio de cultura próprio para isolamento do agente e inoculação em animais de experimentação, e o diagnóstico sorológico. Os testes sorológicos têm especial valor quando os órgãos internos são acometidos, e dentre estes testes, o mais utilizado é a imunodifusão em gel de ágar (RETRESPO, 1994; KWON *et al.*, 1992, ZOILO *et al.*, 2003; ZOILO *et al.*, 2015), sendo amplamente utilizado para verificar se a resposta do paciente frente ao tratamento tem sido positiva ou se está ocorrendo recidiva da doença, sendo a sensibilidade e a especificidade do teste superior a 80% e 90%, respectivamente (SHIKANAI; YASUDA *et al.*, 2006; WANKE; AIDE, 2009, ZOILO *et al.*, 2015).

## 1.2 – Resposta Imune frente a PCM

A patofisiologia da PCM está longe de ser completamente esclarecida (GROSSO *et al.*, 2003). A PCM, assim como outras infecções fúngicas, depende da interação do fungo com a resposta imunológica do hospedeiro para evoluir à cura espontânea ou disseminar pelo organismo, resultando em lesões granulomatosas crônicas (PALMEIRO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008), e essa interação tem sido alvo de pesquisas a fim de esclarecer o que torna um indivíduo susceptível ao fungo, ou o que leva a reativação de um foco endógeno anos após a infecção (SADAHIRO *et al.*, 2007).

A caracterização das células, citocinas e dos mecanismos reguladores que desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da resposta imune protetora tem sido facilitado pelo uso de modelos murinos de infecção pulmonar e intraperitoneal de PCM.

Foram propostos inúmeros modelos experimentais para avaliar a relação parasito-hospedeiro durante infecção pelo *Pb*, e estes, em diferentes espécies tem contribuindo de forma significativa para o estudo da resposta imune no hospedeiro a esta infecção (MOSCARDI; FRANCO 1980).

Em 1985, Calich e colaboradores estabeleceram modelos murinos para o estudo da PCM ao inocular, intraperitonealmente, em 11 diferentes tipos de camundongos isogênicos,  $5 \times 10^6$  leveduras do isolado *Pb18* (altamente virulento). Resultante deste estudo, os autores propuseram uma classificação discriminando diferentes padrões de susceptibilidade e resistência à infecção: 1-Susceptível: linhagens B10.A, B10D2/oSn, B10D2/nSn; 2Intermediário: BALB/c, C57Bl/10, CBA, C3HeB/Fe; 3-Resistente: C3H/He; 4-Altamente resistente: A/Sn, A/J, DBA/2. Ainda, a resistência a infecção, segundo CALICH *et al.* (1998), está também associada à ativação de fagócitos, enquanto a ativação policlonal de linfócitos B, com conseqüente elevação dos níveis de anticorpos específicos, resulta em disseminação do fungo e maior gravidade da doença (CALICH *et al.*, 1998).

De acordo com Singer-Vermes *et al.* (1993), a resposta imune mediada por células é o principal componente da resistência adquirida ao *Pb*, e a resposta humoral específica desenvolve um papel secundário (SINGER-VERMES *et al.*, 1993).

Estudo realizados por Kashino e colaboradores em 1995 evidenciaram o papel dos macrófagos na resistência à PCM pelo bloqueio funcional destas células onde camundongos B10D2/oSn e A/Sn foram inoculados com carbono coloidal, e após 24 horas de infecção intraperitoneal com o *Pb*, resultaram em um aumento da susceptibilidade em ambos os camundongos estudados, trazendo como consequência o agravamento da disseminação das lesões e da mortalidade dos animais.

Em 1986, Mossman e Coffman demonstraram que as células T  $CD4^+$  não são uma única população de células T, mas, na verdade, uma gama de populações distintas capazes de apresentar diferentes funções. Inicialmente essas células foram subdivididas em células  $TCD4^+$ , produtoras de  $INF-\gamma$  e as que produziam IL-4. Posteriormente, foi observado que, dependendo do tipo de sinal ou estímulos as quais essas células eram expostas, essas se diferenciavam em fenótipos distintos, podendo ser do tipo Th1 ou do tipo Th2, onde o primeiro tipo é direcionado a respostas contra patógenos intracelulares, e o segundo para a imunidade de patógenos extracelulares.

Ao contrário da hipótese suposta na doença humana, viu-se que em experimentos de depleção “in vivo” em camundongos nocautes (KO) para genes das moléculas  $CD4^+$  e  $CD8\alpha^+$ , há de fato uma fundamental importância de linfócitos T  $CD8^+$  para o controle da PCM pulmonar. Estes resultados corroboram com os resultados de um estudo de Chiarella e colaboradores (2007) acerca da depleção das células T  $CD4^+$  e células T  $CD8^+$ , onde papel destes subgrupos foram investigados, e seus resultados apresentaram que em camundongos da



linhagem B10A, a depleção de células T CD4<sup>+</sup>, embora apresentasse uma diminuição da produção de anticorpos, não alterou a gravidade da doença.

Por sua vez, a depleção de células TCD8<sup>+</sup>, nesta mesma linhagem, resultou em aumento da carga fúngica, entretanto restaurou a resposta DTH (hipersensibilidade do tipo tardio) e a produção de anticorpos. Em camundongos da linhagem A/J, demonstrou-se que ambos os subtipos celulares (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) apresentaram controle da carga fúngica, mas que somente as células CD4<sup>+</sup> regulavam a reação DTH e a produção de anticorpos. Concluiu-se, neste trabalho, que a carga fúngica em ambas as linhagens de camundongos havia sido controlada, principalmente, pelas células TCD8<sup>+</sup>, e que a produção de anticorpos e a reação DTH são controladas pelas células TCD4<sup>+</sup>. Além disso, estas células desenvolveram, somente em camundongos resistentes, um papel protetor (CHIARELLA *et al.*, 2007).

Mas, para que aconteça a ativação de linfócitos T, são necessários dois sinais. O primeiro, através da molécula de histocompatibilidade principal (MHC de classe II para linfócitos T CD4<sup>+</sup> e MHC de classe I para linfócitos T CD8<sup>+</sup>), onde ocorre a interação entre o complexo TCR do linfócito T com o epítopo exposto pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). O segundo sinal é dependente de um balanço entre moléculas co-estimulatórias ou inibitórias presentes nas APCs, e nos linfócitos T (MUELLER *et al.*, 1989; BRETSCHER, 1982, FELONATO, 2007). E, para que ocorram uma resposta mediada pelos linfócitos T, torna-se necessário a interação destes com as APCs, tais como células dendríticas (DC's), macrófagos e linfócitos B, a proliferação e a diferenciação em células efetoras destes linfócitos, pois, mesmo que estes reconheçam antígenos com alta especificidade, não são capazes de iniciar uma resposta imune (STEINMAN, 1991; BANCHEREAU *et al.*, 2000; LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2001).

Moser *et al.* (2001) demonstraram que é o tipo de célula apresentadora de antígeno que determina o fenótipo do linfócito T. Deste modo, a maneira pela qual ocorre a apresentação antigênica tem também enorme repercussão sobre o tipo de resposta imunológico a ser produzido.

Dentre a classe das APCs, os macrófagos apresentam a maior eficiência em destruir microrganismos devido à exacerbação de funções tais como secreção de substâncias microbicidas, fagocitose, ou como a liberação de radicais derivados do oxigênio (superóxido, radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio). Além disso, este tipo celular é o principal responsável pela defesa celular contra o fungo, uma vez que são capazes de digerir este

patógeno principalmente sob influência do interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), mas incapazes na sua ausência (BACCHI *et al.*, 1994).

Estudos *in vitro* avaliaram a interação de monócitos e macrófagos humanos com o *Pb*, e observaram que as leveduras, embora apresentavam capacidade de crescimento em meio intracelular, eram facilmente fagocitadas por estas células. Entretanto houve, em 95% das células, uma acentuada restrição da multiplicação do fungo quando os macrófagos foram tratados com IFN- $\gamma$ , sugerindo que poderiam ocorrer multiplicação das leveduras fúngicas dentro de monócitos ou macrófagos, e que esta multiplicação pode ser inibida quando essas células estão ativadas (MOSCARDI-BACCHI *et al.*, 1994). Dessa forma, macrófagos estimulariam clones de células T a secretarem citocinas tais como IL-2 e IFN- $\gamma$ , enquanto células B ativariam clones Th2, produtores de IL-4 e IL-10 (FIORENTINO *et al.*, 1991; GAJEWSKI *et al.*, 1991)

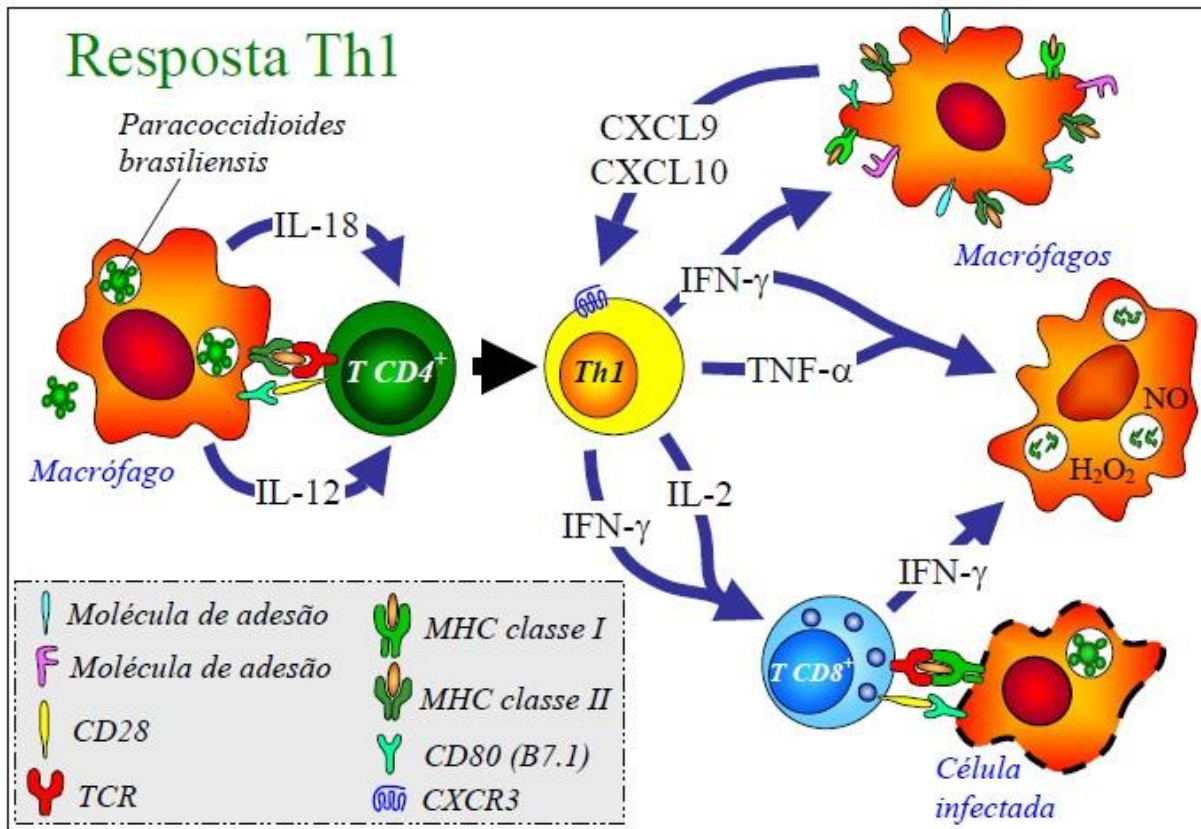
Almeida *et al.* (1998), Almeida e Lopes (2001), Ferreira *et al.*, (2003) e Ferreira *et al.*, (2004), em seus resultados observaram que camundongos resistentes apresentam, preferencialmente, antígenos de *Pb* por macrófagos e células dendríticas, estimulando a uma resposta do tipo Th1. Por sua vez, animais susceptíveis, apresentam antígenos via células B, traduzindo em uma forte ativação de subpopulação Th2.

Nos dois tipos de respostas, há produção de citocinas com funções específicas que direcionam a modulação da resposta imune. Enquanto o tipo Th1 sintetiza INF- $\gamma$ , que apresenta capacidade de ativação da atividade microbicida dos macrófagos (SUZUKI *et al.*, 1988) e IL-2, que é precursora de células Th1 de memória (WILLIAMS *et al.*, 2006), o tipo Th2 apresenta produção de diversas citocinas, tais a IL-4 que faz o “feedback” para a diferenciação de células T “naive” em célula Th2 (LE GROS *et al.*, 1990; SWAIN *et al.*, 1990), IL-10 que tem como função diminuir a proliferação de células Th1 (FIORENTINO *et al.*, 1989) e também pode suprimir a função de DCs (MOORE *et al.*, 2001).

Para que ocorra uma proteção eficiente, parece ser necessário a formação de um complexo circuito imunoregulatório, através de um balanço dos diferentes grupos de citocinas (ROMANI *et al.*, 1997; CALICH; KASHINO, 1998; KARHAWI; COLOMBO; SALOMÃO, 1999).

Estudos a respeito das diversas citocinas têm sido elaborados afim de compreender sua função imunoregulatória na PCM murina experimental. Resultados prévios obtidos no modelo de infecção intraperitoneal sugerem que, há uma associação à ativação preferencial de células Th1 e resistência ao *Pb*, quando frente a níveis elevados e precoces de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 por animais A/Sn. Em contrapartida, a produção de baixos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e níveis

elevados de IL-5 e IL-10, está relacionada ao predomínio de uma resposta Th2 e a progressão, em animais susceptíveis, da doença (KASHINO; CALICH, 1998) (FIGURA 1).



**Figura 1 - Representação esquemática da resposta imunológica que confere resistência à infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, em modelo murino.** Após a infecção, macrófagos ou células dendríticas apresentariam antígenos do fungo para linfócitos T CD4+. Essa apresentação induziria a produção de IL-12 e IL-18, tendo como molécula co-estimulatória o CD80, dirigindo, portanto, uma diferenciação em linfócitos Th1. Os linfócitos Th1 produziram IFN- $\gamma$ , que tem como finalidade, o aumento de expressão de moléculas co-estimulatórias, de adesão e de apresentação de antígeno nos macrófagos, tornando-os mais eficientes na apresentação de antígenos. Não obstante, a produção de IFN- $\gamma$  resultaria em um aumento de secreção de quimiocinas como a CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10) que atrairiam outras células Th1 (que apresentam o receptor para quimiocinas CXCR3). Atuando em conjunto com o TNF- $\alpha$ , estaria o IFN- $\gamma$  para a ativação do metabolismo oxidativo de macrófagos com aumento substancial da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) e NO (óxido nítrico), importantes para a destruição do fungo. Linfócitos Th1 também estariam secretando IFN- $\gamma$  e IL-2, que por sua vez, agiria na ativação de linfócitos T CD8+, sendo esta uma importante fonte de IFN- $\gamma$ , além de serem responsáveis pela destruição de células infectadas liberando leveduras para serem destruídas por macrófagos ativados (RETIRADO DE MAMONI, 2004).

Sabe-se também que o IFN- $\gamma$  atua por meio da ativação de macrófagos, aumentando seu metabolismo oxidativo, fazendo com que haja, assim, intermediários reativos de oxigênio, tais como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CALVI *et al.*, 2003), e de nitrogênio, principalmente Óxido Nítrico (NO), através da ativação de macrófagos (GONZALES *et al.*, 2000; AKTAN, 2004), que possui capacidade de inibir a transformação dos conídios em leveduras, favorecendo a destruição do fungo (BRUMMER *et al.*, 1988).

Kashino e colaboradores, em 1995, demonstraram que, dessa forma, a participação de macrófagos ativados é de suma importância para resistência a infecção por *Pb*, e Souto *et al.*

(2000), observaram que camundongos com deficiência na produção de IFN- $\gamma$  apresentavam uma maior susceptibilidade à infecção pelo fungo, devido a menor produção de NO, quando comparados aos camundongos do tipo selvagem.

Souto e colaboradores (2003), demonstraram a modulação da produção de quimiocinas nos pulmões de camundongos infectados com o fungo, pelo IFN- $\gamma$ , ao induzir quimiocinas associadas a resposta Th1 e seus receptores. Posteriormente, Cano *et al.* (1998) e Souto *et al.* (2000), observaram em camundongos depletados ou geneticamente deficientes (nocaute) para IFN- $\gamma$  são altamente susceptíveis à PCM, tendo em vista que produzem granulomas frouxos, sucumbindo a doença em pequeno espaço de tempo, devido a rápida disseminação fúngica.

Como podemos observar na FIGURA 1, outra importante citocina mediadora da resposta imune do tipo Th1, na PCM, é a IL-12.

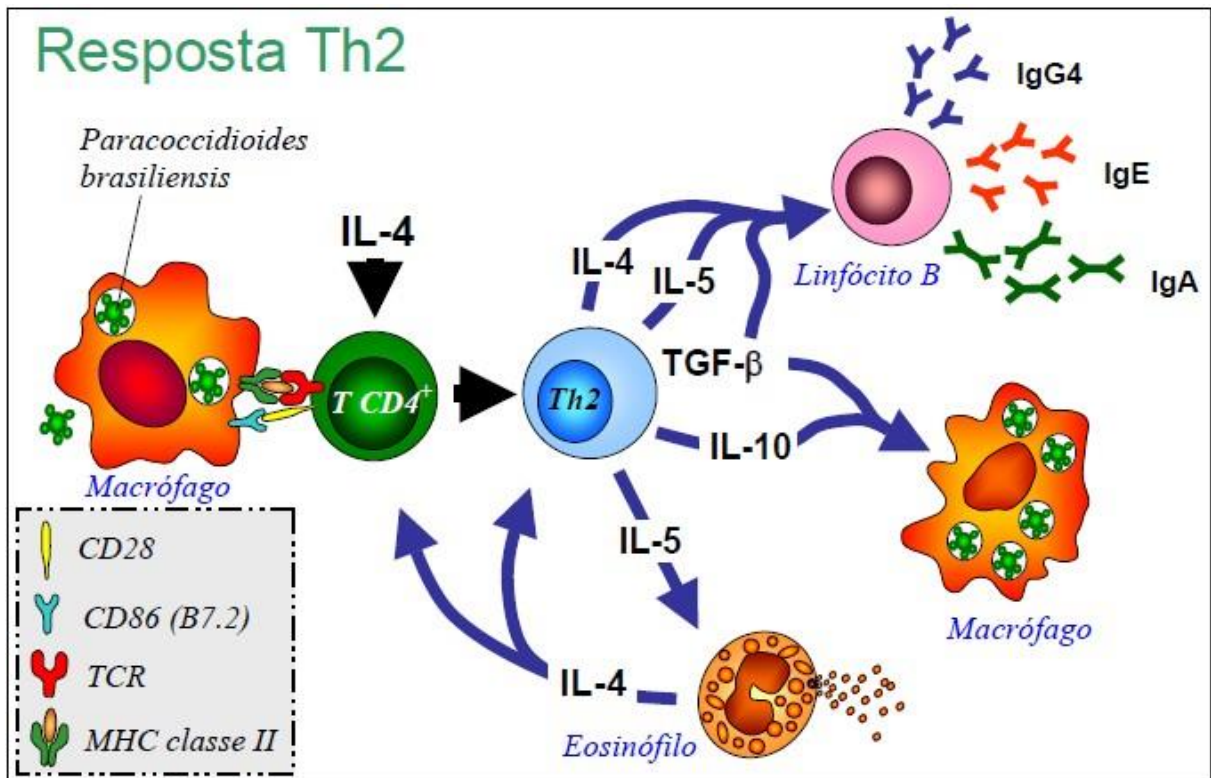
A IL-12 é a principal citocina inflamatória produzida por linfócitos B, células fagocíticas e outras células apresentadoras de antígeno, tendo, portanto, capacidade de modular a resposta imune e fornecer um elo importante entre a resposta imunológica inata e adaptativa (TRINCHIERI, 2003; GATELY *et al.*, 1998; FIESCHI; CASANOVA, 2003).

De acordo com D'Andrea e colaboradores, a IL-12 tem como uma das atividades fisiológicas preponderantes a capacidade de induzir a produção de IFN- $\gamma$  por células T e Natural Killer (NK), e aumentar a atividade dessas células e de macrófagos contra vários patógenos intracelulares (TRINCHIERI, 1994; GATELY *et al.*, 1998; FIESCHI; CASANOVA, 2003).

Na PCM experimental, uma maior produção de IL-12 foi encontrada em camundongos resistentes, evidenciando a sua importância para a diferenciação da resposta protetora Th1 (CALICH; KASHINO, 1998; ARRUDA *et al.*, 2002), e, de acordo com Calich e Kashino (1998), o efeito protetor dessas citocinas está associado à diminuição dos níveis de IL-4 e IL-10, consideradas citocinas Th2.

Arruda e colaboradores (2004), descreveram a importância da IL-4 na modulação positiva ou negativa do padrão de suscetibilidade do hospedeiro ao *Pb*, onde os resultados demonstraram que, dependendo do padrão genético do hospedeiro, a IL-4 pode exercer diferentes funções na PCM pulmonar. Em camundongos suscetíveis, por exemplo, a depleção de IL-4 levou ao aumento da carga fúngica pulmonar. Entretanto, a depleção *in vivo* de IL-4 demonstrou que a IL-4 não é o principal mediador na suscetibilidade à PCM pulmonar, uma vez que foi menos severa em animais com padrão intermediário da doença, e foi associada com o aumento da produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 e diminuição de IL-5. Como descreve o grupo,

talvez outra citocina, como a IL-10 poderia estar mediando esta suscetibilidade, como podemos ver na Figura 2, abaixo:



**Figura 2 – Representação esquemática da resposta imunológica que confere suscetibilidade à infecção, em modelo murino, pelo *Paracoccidioides brasiliensis*.** Macrófagos ou células dendríticas apresentariam antígenos do fungo para linfócitos T CD4<sup>+</sup> na presença de IL-4, após a infecção. Neste caso, a molécula co-estimulatória CD86 estaria atuando dirigindo a diferenciação dos linfócitos para T “helper” 2 (Th2). Os linfócitos do tipo Th2, por sua vez, teria atuação sobre linfócitos B, aumentando a produção de anticorpos, produzindo IL-4, IL-5 e TGF-β, influenciando assim a mudança de classes. IL-10, por sua vez, seria produzida por linfócitos Th2, que, induziria a desativação de macrófagos, reduzindo a capacidade fungicida dessas células, através da ação conjunta com o TGF-β, propiciando dessa forma a multiplicação e disseminação do *Paracoccidioides brasiliensis*. A mobilização de eosinófilos, na medula óssea, estaria ocorrendo via produção de IL-5, sendo, portanto, responsável pela eosinofilia periférica e tecidual observada nas formas mais graves da paracoccidioidomicose (RETIRADO DE MAMONI, 2004).

Assim, pode-se dizer que a IL-10 possui um papel fundamental no que diz respeito a infecção por *Pb*, uma vez que ela é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias amplas, que incluem desde a inativação de macrófagos, células dendríticas, passando pela diminuição da expressão das citocinas pró- inflamatórias (incluindo IL-1α e β, IL-6, IL-12, IL-18 e TNF-α) e quimiocinas tais como RANTES e IL-8, à repressão da expressão de antígenos do complexo MHC de classe II e das moléculas co-estimulatórias B7-1/B7-2 (CD80/CD86) (MAMONI, 2005).

Além da resposta imune celular, sabemos que a resposta humoral também é importante na PCM. Baida e colaboradores (1999), investigaram a relação da resposta humoral contra a glicoproteína de 43 kilodaltons (gp43), o principal componente antigênico do *Pb*, entre pacientes com a forma juvenil e a forma adulta da PCM, e observaram que pacientes com a

forma juvenil tinham maiores níveis de IgG anti-gp43 do que pacientes com a forma adulta. Assim, estes autores compararam os níveis das subclasses de IgG entre as duas formas da doença e viram que os níveis de IgG4 se mostravam maiores na forma juvenil do que na adulta e o mesmo não acontecia quanto aos níveis de IgG2. O switch da IgG4 é regulado pela produção de IL-4, enquanto que o do isotipo IgG2 é controlado pela produção de INF- $\gamma$ . Estes resultados sugerem que a mudança para as subclasses IgG em PCM é regulada por um subconjunto T helper (Th1 ou Th2) do perfil de citocinas dominante.

Em camundongos, a secreção de IgG2a é influenciada diretamente pela presença de INF- $\gamma$  e IL-27 no ambiente onde se encontra o linfócito B (BOSSIE; VITETTA, 1991; YOSHIMOTO *et al.*, 2004). Dessa forma, as diferentes classes de anticorpos produzidas durante uma infecção podem ser tomadas como indicativos indiretos do tipo de citocina que predomina no organismo infectado (MAMONI, 2005).

Além das citocinas, várias células desempenham papel central no que diz respeito a resistência ao *Pb*. Dentre elas, destacam-se as células NK, neutrófilos, monócitos, células dendríticas e macrófagos. A participação dessas células na atividade fungicida e, na reação inflamatória, são induzidas por fungos e por citocinas produzidas pelas células durante a interação com os fagócitos (PAGLIARI *et al.*, 2010).

Recentemente estudos demonstraram que camundongos resistentes a PCM apresentavam células dendríticas mais eficientes na produção de uma resposta tipo Th1 tanto *in vivo* quanto *in vitro*, quando comparadas as células de camundongos susceptíveis (ALMEIDA; LOPES, 2001; FERREIRA *et al.*, 2003), e, nosso grupo demonstrou, que células dendríticas imaturas ou ativadas com lipopolissacarídeos (LPS) inibem tanto a expressão de moléculas co-estimulatórias quando a produção de IL-12 na presença de gp43 de *Pb* (FERREIRA *et al.*, 2006).

Inúmeras funções biológicas têm sido propostas para a gp43. Esta glicoproteína é constitutivamente expressa nas fases de micélio e de levedura (GOLDANI *et al.*, 1994) e aparentemente está presente em todos os isolados do fungo analisados (LOPES *et al.*, 1994), demonstrando sua importância biológica.

Dada à importância da gp43, Puccia e Travassos (1991) obtiveram anticorpos monoclonais (MAbs) dirigidos contra esta glicoproteína, e em 1996, estes anticorpos foram caracterizados por Gssztesi e colaboradores, mostrando que os MAbs anti-gp43 reconhecem porções peptídicas na molécula alvo, uma vez que nenhuma inibição da ligação dos MAbs à gp43 por açúcares pôde ser detectada.

Em PCM, Souza e colaboradores (1998), demonstraram em ratos imunizados com MAbs anti-gp43 a existência espontânea da rede idiotípica na resposta imune à gp43 de *Pb*, produzindo ambos os anticorpos anti-idiotípicos (Ab2), bem como anticorpos anti-anti-Idiotípicos (Ac3). Verificou-se também, em soros de paciente com PCM, quantidades significativas de Ab2, apontando para uma modulação espontânea da cascata idiotípica no sistema de gp43, que foi explicado por Jerne, em 1974.

A teoria da rede idiotípica inicialmente proposta por Jerne (1974a), demonstrava uma nova ótica sobre a atividade linfocitária, a produção de anticorpos, a seleção do repertório pré-imune, bem como a memória e a evolução do sistema imunológico, ao invés de explicar os processos de sinalização e a interação de anticorpos, e seus mecanismos efetores (VARELA; COUTINHO, 1991).

De acordo com a hipótese da rede idiotípica proposta por JERNE (1974):

“O sistema imunológico é constituído por uma rede enorme e complexa de parátomos que reconhecem conjuntos de idiotomos, e de idiotomos que são reconhecidos por conjuntos de parátomos, assim, cada elemento pode reconhecer e ser reconhecido” Jerne, 1974a.

Assim, Jerne postulou que uma rede regulada de células e moléculas que se reconhecem mesmo na ausência de antígenos é o que de fato compõe o sistema imunológico. E, nessa nova proposta, o termo de região de ligação do anticorpo, ou região V, denominava-se de parátomo, enquanto o determinante antigênico seria reconhecido como epítomo, sendo, portanto, características fundamentais para o reconhecimento imunológico.

Considera-se idiotopo a porção da região variável da molécula do anticorpo que interage com o antígeno, podendo atuar como anticorpo frente a um antígeno, e como antígeno frente a um anticorpo anti-idiotípico (Id). Assim, a teoria da rede idiotípica está fundamenta na interação concomitante dos anticorpos produzidos por um indivíduo, em suas regiões variáveis dos anticorpos, produzidos por um indivíduo (COUTINHO, 2003; SOUZA *et al.*, 2010).

O sistema imune, em tese, então enxergaria a si mesmo resultando em uma resposta que ocasionaria um aumento do primeiro anticorpo (Ab1), que, ao ser reconhecido por Ab2, acarretaria em um aumento do mesmo, e o mesmo aconteceria para Ab2 e Ab3, tendendo sempre à restauração do equilíbrio do sistema (LAN *et al.*, 2015).

Uma vez que os próprios anticorpos também podem ser antígenos, anticorpos dirigidos contra as regiões variáveis anti-Ab1 (ou Ab2) são geralmente conhecidos como anticorpos anti-idiotípicos. Contudo, existem diferentes tipos de Ab2: (i) Ab2 $\alpha$ , que reconhece um idiotopo, ou seja, um epítopo no idiotipo, não estruturalmente relacionado ao parátopo de Ab1; (ii) os anticorpos anti-idiotípicos conhecidos como Ab2 $\beta$  se ligam ao parátopo de Ab1 e mimetizam o epítopo original, o que significa que quando se comportam como antígenos, induzem uma resposta anti-Ab2 (Ac3) semelhante ao Ab1 (chamado Ab1'). Ou seja, estes anticorpos Ab2 $\beta$  mimetizam a "imagem interna" do antígeno (JERNE, 1974a; SOUZA *et al.*, 1998; ZHOU; AMERI, 2005; LAN *et al.*, 2015), e por este mimetismo, são vistos com grande interesse pelos imunologistas, (SOUZA *et al.*, 2004; JANUZZI, 2013).

Souza, em 1999, ao investigar a evolução da imunização de camundongos com PCM com três Mabs anti-gp43 diferentes (17c, 8a e 24<sup>a</sup>) acoplados com KHL demonstraram a presença de anticorpos Ab2 nos soros destes animais, e uma quantidade cresce de Ab3 depois da terceira imunização. Então, utilizando células dos baços de camundongos imunizados com Mab17c, obtiveram hibridomas produtores de Mabs Ab2 e Ab3. E demonstraram que soros de pacientes que apresentavam altos títulos de anticorpos anti-gp43 geram espontaneamente anticorpos Ab2, e que anticorpos Ab2 humanos purificados foram capazes de reconhecer especificamente o idiotipo de alguns Mabs anti-gp43 murinos (17c e 3e), mas não outros (40.d7, 27a e 8a).

Souza *et al.* em 2004, demonstraram, em ensaios de ELISA, que, uma vez que soros de pacientes com PCM reconhecem o Mab Ab2 $\beta$  7B12 em detrimento à gp43, estes Mabs Ab2 podem ser utilizados para substituir antígenos em ensaios sorológicos. Ainda, demonstraram que quando os camundongos eram imunizados com Ab2 $\beta$ , e estimulados *in vitro* com a gp43, ocorria uma produção de IFN- $\gamma$ , que modulava uma resposta proliferativa de células T, sugerido que há epítomos responsáveis pela ativação de linfócitos T.

Numerosas pesquisas têm sido feitas, e demonstram a aplicabilidade biológica desses anticorpos Ab2 $\beta$ , tais como estudos em cânceres humanos (BHATTACHARYACHATTERJEE *et al.*, 2000), como em neuroblastomas (UTTENREUTHER-FISCHER *et al.*, 2006), hormônios de crescimento (ELBASHIR *et al.*, 1990; GARDNER *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 1994; ROBERGE *et al.*, 1999; RAJPUT *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2013; LAN *et al.*, 2015), micotoxinas (MARAGOS, 2009; SHU *et al.*, 2015). Além disso, estes anticorpos estão sendo explorados no desenvolvimento de novas vacinas, terapia contra tumores, e como reagentes de imunodiagnóstico (ZHOU; AMERI, 2005).



A capacidade de Ab2 $\beta$  na indução de respostas imunológicas, tanto de anticorpos, quanto por células T para determinados patógenos tem sido demonstrada em inúmeros modelos de sistemas, incluindo os vírus, tais como vírus de leucemia murina, vírus de tumor mamário murino (MMTV), reovírus, poliovírus, vírus da raiva, vírus da hepatite B, e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (FRANCOTTE; URBAIN, 1984; KENNEDY, DREESMAN, 1984; KENEDDY *et al.*, 1986; THANAVALA *et al.*, 1986; THANAVALA, ROITT, 1986; SCHICK *et al.*, 1987; ZHOU *et al.*, 1987, 1990; OOSTERLAKEN *et al.*, 1991; ORTEN *et al.*, 1991; DINCA *et al.*, 1993; AMERI *et al.*, 2005), bactérias tais como *Escherichia coli*, *Pneumonia streptococcus*, e *Brucella abortus* (MCNAMARA *et al.* 1984; KAUFMANN, 1985; SU *et al.*, 1992) e parasitas como *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, e *Schistosoma mansoni* (CHAVEZ-RUEDA *et al.*, 2002).

O desenho de moléculas recombinantes de anticorpos artificiais, que são normalmente produzidos na forma de fragmentos polipeptídicos, com capacidade de se comportarem de forma idêntica ao anticorpo original só foi possível graças ao avanço das técnicas de DNA recombinante (CAETANO, 2006). E a forma mais utilizada é o fragmento de cadeia única das regiões variáveis de anticorpo (scFv), que contém os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas unidas por um peptídeo conector (linker), e apresentam peso molecular de cerca de 30 kDa (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

Esse tipo de engenharia tornou-se possível devido a divisão dos anticorpos em subunidades funcionais, que podem ser combinados artificialmente para criar novas moléculas, gerada pela estrutura em domínio dos anticorpos. Nesse sentido, tornou-se peça chave no tratamento de diversas doenças, o desenvolvimento de novas imunoglobulinas (Ig) recombinantes, visto que, a sua especificidade característica faz com que elas atuem em um alvo específico, elevando a eficácia do tratamento (SIQUEIRA, 2010).

De acordo com Maranhão e Brígido (2002), o scFv é composto pelas cadeias variáveis leve e pesada e pode ser obtido na forma recombinante. Essa molécula trata-se de um arranjo monocistrônico onde, através de um peptídeo conector flexível (Gly4Ser)<sub>3</sub>, une-se o carboxiterminal do VH com o amino-terminal do VL ou vice-versa, por exemplo, e mimetiza a região Fv do anticorpo, mantendo a mesma especificidade de ligação ao antígeno.

Estudos têm demonstrando que este fragmento tem sido a forma mais corrente, podendo ser expressos em bactérias e eucariotos, e existe a possibilidade de obtenção de scFvs bivalentes, tais como o *diabody*, onde duas cadeias de VHs estão ligadas diretamente às VLs que se conjugam formando duas regiões de reconhecimento ao antígeno (CHOI *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2004), ou ainda em três cadeias VHs ligadas a três cadeias VLs conjugadas,

formando os “triabodies” (HOLLIGER; HUDSON, 2005). Variações destes fragmentos, como por exemplo o FvFc, que se constitui em um scFv unido aos domínios CH2 e CH3 de IgG, e retém a capacidade de ligação ao antígeno e atividade efetora, também podem ser expressas em sistemas microbianos (HUSN *et al.*, 1991).

Construídos essencialmente de hibridomas (GALEFFI *et al.*, 2006; DENG *et al.*, 2003), células de baço de camundongos imunizados (FINLAY *et al.*, 2006) e linfócitos B humanos (ZHANG *et al.*, 2006), essa construção tem sido utilizada em diversos modelos terapêuticos contra hapteno (KOBAYASHI *et al.*, 2005), proteínas (DAI *et al.*, 2003; GUO *et al.*, 2003), hidratos de carbono (RAVN *et al.*, 2004; SAKAI *et al.*, 2007), antígenos contra tumores (SHADIDI; SIOUD, 2001) e vírus (HU *et al.*, 2005).

Um estudo realizado por Kuroki e colaboradores (2000), no desenvolvimento de um vetor retroviral que exibe Anti-CEA-scFv contra antígeno carcinoembriogênico humano (CCEA), demonstrou que este retrovírus recombinante possuía capacidade de infectar e matar células cancerosas que expressavam CEA. Li *et al.* (2001), ao estudar vetores virais que transportavam scFv anti-ErbB2 contra um receptor associado a cancro de ovário, demonstrou-se que esses vetores eram capazes de entregar DNA exógeno em células que expressam o receptor ErbB2, quando comparados as células que não expressavam estes receptores, auxiliando assim no tratamento da doença.

Strube e Chen (2002), demonstraram que anticyclin e scFv são expressos em células relacionadas ao cancro de mama, podendo inibir o crescimento celular. Outro estudo, conduzido por Strube e Chen (2002) demonstrou que anticyclin e scFv que são expressos no núcleo da linhagem de células do cancro da mama pode inibir o crescimento de células cancerosas.

Os scFv têm sido utilizados em terapia (CHESTER; HAWKIM, 1995) e diagnósticos, e têm mostrado vantagens sobre anticorpos monoclonais e convencionais (LORIMER *et al.*, 1996; TURNER *et al.*, 1997; WINTLOW, FILPPULA, 1991).

Nosso grupo de pesquisa, em 2011, construiu o scFv a partir de anticorpos Ab2 $\beta$ , que mimetizam o antígeno gp43 de *Pb*. Posteriormente, utilizando o plasmídio (pMAC/PS) que codifica o scFv, criou-se o pMAC/PS-scFv-DC, ao realizarmos a transfecção em células dendríticas. Esta construção demonstrou resultados satisfatórios frente a terapia da infecção causada pelo fungo quanto a apresentação da proteína scFv, pelas células dendríticas, às células dos linfonodos regionais, resultando assim na indução da linfoproliferação específica ao antígeno gp43, e a diminuição da carga fúngica pulmonar (JANUZZI, 2013).

A aplicação dessas moléculas tem apresentado certas vantagens em relação à utilização de uma molécula de anticorpo inteira em aplicações terapêuticas (COLCHER *et al.*, 1998; HUDSON, 1999): a) os fragmentos menores permitem a penetração de forma mais rápida e uniforme em tumores e outros tecidos em comparação com os anticorpos inteiros (YOKOTA *et al.*, 1992, COLCHER *et al.*, 1998), b) apresentam circulação sanguínea rápida. George e colaboradores (1996) demonstraram que pacientes tratados com scFv apresentavam boa localização das moléculas em apenas uma hora após a sua injeção; c) boa penetração nos tecidos; d) baixa retenção nos rins e outros órgãos não-alvo (WINTLOW; FILPPULA, 1991; KIM *et al.*, 2002); e) maior facilidade de manipulação gênica, por tratar-se de uma construção monocistrônica (WINTLOW, FILPPULA, 1991; JANUZZI, 2013); f) custo comercial baixo em grande escala de produção (WINTLOW, FILPPULA, 1991); g) podem ser acoplados com drogas e radionuclídeos, a fim de resultar em baixa exposição do tecido saudável (TURNER *et al.*, 1997; STIPSANELLI; VALSAMAKI, 2005; ORIUCHI *et al.*, 2005). Em contrapartida, o tamanho molecular pequeno do scFv têm a desvantagem fisiológica de eliminação rápida a partir do corpo através do rim (WINTHROP *et al.*, 2003; PETERSON *et al.*, 2006).

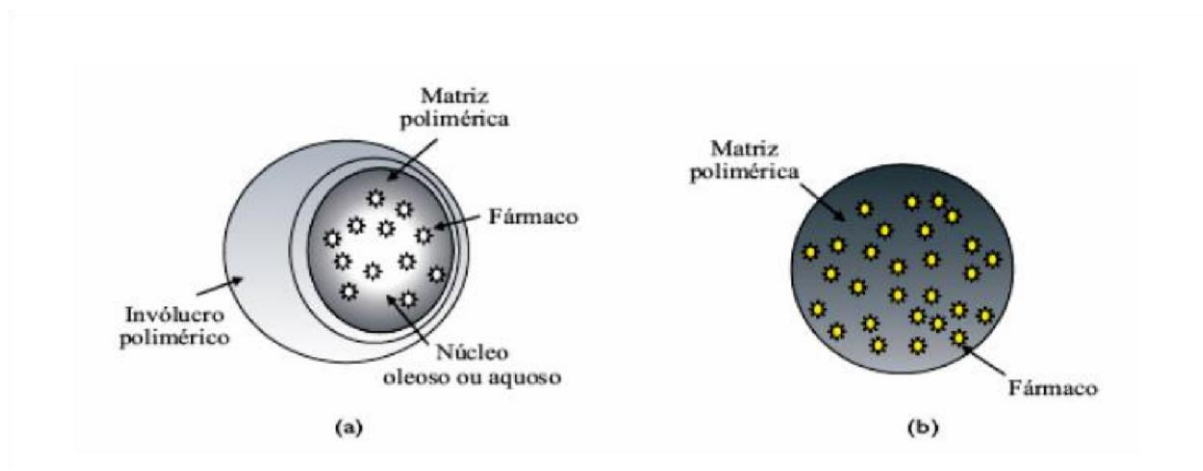
Um sistema atrativo para as vacinas, devido a potencialidade de entregar, aos poucos e pouca quantidade de antígeno, são os polímeros biodegradáveis (COMMANDEUR, *et al.*, 2006). Em PCM, resultados de Amaral e colaboradores (2009) mostraram a eficácia do tratamento após a redução da quantidade de peptídeo utilizada na indução de um efeito protetor quando encapsularam o peptídeo p10 de gp43 em nanopartículas com polímeros biodegradáveis, e o administraram em combinação com drogas antifúngicas durante o tratamento do modelo murino de PCM sistêmica. Em 2011, nosso grupo de pesquisa demonstrou também que a molécula de scFv que mimetiza a gp43 de *Pb*, possui região de reconhecimento e ativação de linfócitos T (scFv), sendo, portanto, eficiente em um modelo de terapia na PCM experimental (FERREIRA *et al.*, 2011).

De acordo com Mohanraj e Chen (2006), nanopartículas poliméricas são partículas sólidas com tamanho variável entre 10 a 1000 nm. Nas últimas décadas, estas partículas têm sido estudadas como possíveis carreadores de substâncias ativas e drogas (COUVREUR, *et al.*, 1995; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), tendo uma gama variada de vias para administração: oral, oftálmica, tópica, intravenosa (COUVREUR, *et al.*, 1995; CRUZ, *et al.*, 2006), nasal e pulmonar (DOBROVOLSKAIA; MC NEIL, 2007).

As vantagens da utilização dessas partículas como carreadoras são: (1) fácil manipulação; (2) aumento da estabilidade de drogas e proteínas; (3) controle maior da liberação da droga, durante o transporte e no local da ação, alterando sua pureza e reduzindo

possíveis efeitos colaterais, melhorando a eficácia terapêutica; (4) devido a sua maior superfície de contato, oferece maior interação celular (MOHANRAJ; CHEN, 2006; LOBATTO *et al.*, 2011); e (5) utilização em alvos específicos através da utilização de ligantes sítios-específicos como proteínas, peptídeo e anticorpos monoclonais ou seus fragmentos (LOBATTO *et al.*, 2011).

O termo nanopartícula é um nome coletivo para nanocápsulas e nanoesferas, que consistem em sistemas coloidais sintetizados a partir de polímeros (Figura 3) e são apropriadas para transportar peptídeos, fármacos, antígenos e vacinas de DNA. São também biodegradáveis e biocompatíveis e diferem entre si quanto à composição e estrutura (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000) (FIGURA 3).



**Figura 3** – Esquema representativo de uma nanocápsula (a) e de uma nanoesfera (b). (RETIRADO DE AMARAL AC E FELIPE MSS, 2008)

As nanoesferas possuem uma estrutura do tipo matriz onde o fármaco pode estar adsorvido na superfície da esfera ou incrustado na matriz polimérica, já as nanocápsulas são sistemas vesiculares nos quais o fármaco está confinado em uma cavidade que consiste de um núcleo líquido circundado por uma membrana polimérica, podendo carrear moléculas sensíveis a ação do meio fisiológico. (COUVREUR *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2006).

As partículas de PLGA (ácido-lático-co-ácido-glicólico) tem sido usadas há muito tempo como sistemas de entrega de fármacos devido às muitas vantagens que ele apresenta: alta estabilidade, fácil entrada nas células por endocitose e direcionamento para órgãos alvo-específico pela adição de moléculas funcionalizantes, além da possibilidade de pré-determinar a sua taxa de degradação por meio de diferentes proporções do ácido poli-ácido-lático (PLA) e ácido glicólico (PGA) (AMARAL, 2009).

Devido ao crescente número de casos de resistência às drogas atuais, novas terapias contra micoses têm se tornado de fundamental importância para a saúde mundial. Uma

alternativa eficiente e segura, com o intuito de diminuir as concentrações de fármacos utilizadas, bem como o número de aplicações no paciente sem afetar a eficiência do tratamento, é a conjugação dos medicamentos em nanoencapsulados (FUKUI *et al.*, 2003; KLEINBERG, 2006).

Assim, pela experiência do grupo na utilização do scFv recombinante no modelo experimental murino para PCM, e a importância de novas técnicas de carreamento de fármacos, esta dissertação tem, portanto, como foco o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para combater as infecções fúngicas causadas por *P. brasiliensis*.

## **2 OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

Analisar se o uso de nanopartículas poliméricas conjugadas com nosso scFv em sua forma recombinante, seria capaz de induzir maior eficiência desses fragmentos de anticorpos, potencializando a continuidade de sua ação, na PCM experimental.

### **Os principais objetivos deste trabalho são:**

- Expressão e caracterização do scFv em *Pichia pastoris*;
- Comparar através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) o efeito da terapia com nanocápsulas conjugadas ao scFv em camundongos infectados previamente com *Pb18*.
- Caracterizar o perfil de células (macrófagos, e células dendríticas) no pulmão dos camundongos infectados e tratados;
- Avaliar a modulação da resposta imune induzida (Th1/Th2 e Th17) na terapia através da dosagem das citocinas (IL-10, IL-12, IFN-  $\gamma$ , IL-17 e IL-4);
- Avaliar a capacidade do scFv conjugado à nanocápsulas em modular a produção de imunoglobulinas;

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos isogênicos machos da linhagem BALB/c, com 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram obtidos no Biotério de Camundongos Isogênicos da USP, aprovados pelo comitê de ética protocolo CEUA 447, e criados em condições SPF (“specific pathogens free”), alimentados com ração comercial irradiada. Os camundongos foram eutanasiados de acordo com os critérios estabelecidos pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – CEUA/FCF.

#### **3.2 Fungo**

Foi utilizada a cepa virulenta *Pb18* de *Pb* para infecções intratraqueais (KASHINO *et al.*, 1987). A cepa foi mantida em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-ágar (SDA; DM200, Mast Diagnostics, Merseyside, UK), em estufa de 36C°, com repiques semanais para manutenção da virulência.

#### **3.3 Infecção intratraqueal**

Os animais foram infectados por injeção intratraqueal (i.t.) com suspensão contendo  $1 \times 10^6$  células/mL de leveduras viáveis de *Pb* contidas em 50µL de *PBS*. O procedimento foi realizado com os animais sob efeito de anestésico, seguindo o esquema: 1) administração de 10mL/kg de peso de solução de cloridrato de 2-(2-6-xilidino) 5,6 dihidro-4H-1,3-tiazina (ROMPUN, Bayer do Brasil – SP) a 0,4% pela via intraperitoneal; 2) após 10 minutos, administração de 10 mL/kg de peso de hidrato de cloral (Reagen do Brasil) a 2,5% também pela via intraperitoneal. Quando o animal estava insensível à dor, era feita uma pequena incisão longitudinal na pele do pescoço, e a traqueia exposta. A suspensão fúngica fora então administrada em volume total de 50µL de *PBS*. Após inoculação, a incisão saturada e os animais colocados sob uma fonte moderada de calor para controlar a hipotermia transitória produzida pela anestesia, até acordarem.

#### **3.4 Linhagem bacteriana**

DH5-alfa: supE44,  $\square lacU169$ . Esta linhagem de *Escherichia coli* foi utilizada para amplificação dos plasmídeos pMAC/PS-scFv e pPIgLEZ22.

### 3.5 Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados durante as etapas de clonagem e expressão foram:

- **pMAC/pS-scFv**: codifica para o scFv obtido a partir do Mab Ab2 que mimetiza a gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis*, construído por nosso grupo (Ferreira *et al.*, 2011).

- **pPIgLEZ22**: 8955Pb, promotor AOX1, múltiplos sítios de clonagem, construído pelo grupo da Profa. Dra. Andréia Maranhão da UnB para ser utilizado em expressão em leveduras. Este plasmídeo apresenta uma fusão da proteína recombinante com proteína A como forma de detecção para Western Blot e ELISA, além de ser uma estratégia de purificação.

### 3.6 Transformação do pMAC/pS-scFv e pPIgLEZ22 para amplificação do produto por choque térmico

Os plasmídeos pMAC/pS-scFv e pPIgLEZ22 foram transformados em bactérias *Escherichia coli* competentes para amplificarmos a quantidade de inserto e de vetor. Aproximadamente 1uL de DNA plasmidial foi adicionado a 100uL de bactérias competentes e incubados em banho de água-gelo por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 42° C por 3 minutos e então, adicionamos 1mL de meio LB para nova incubação de 1 hora a 37° C sob agitação de 250 rpm. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 500g por 2 minutos, e o sobrenadante desprezado. As amostras foram ressuspensas em 50uL de meio LB e plaqueadas em LB Agar contendo 100ug.mL de ampicilina. As placas foram incubadas por 20 horas em estufa a 37° C e após crescimento das colônias, selecionamos 3 clones, os quais foram utilizados na mini preparação plasmidial.

### 3.7 Extração do DNA plasmidial – Miniprep

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o kit da Invitrogen (Purelink Quick Plamid Miniprep - Cat. K2100-10). A suspensão bacteriana foi centrifugada por 20 min a 13000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e precipitado bacteriano foi ressuspenso em 250 µL de tampão R3 (contendo RNase) gelado, vortexado e transferido para microtubo. As bactérias foram lisadas com 250uL de tampão de lise (L7) e incubadas, com homogeneização freqüente, por no máximo 5 minutos à temperatura ambiente. O lisado de bactérias foi



neutralizado adicionando-se 350  $\mu$ L de solução de neutralização (N4), invertendo imediatamente e gentilmente (a solução fica com aparência de nuvem, com grumos brancos). Após centrifugação durante 10 min a 12000g, os debris celulares foram precipitados e o DNA permaneceu em solução. O sobrenadante foi transferido para coluna de troca iônica. A coluna foi centrifugada por 60s a 13000 rpm, essa foi lavada com 750  $\mu$ L de tampão de lavagem (W). O DNA plasmidial foi eluído com 75  $\mu$ L de tampão de eluição pré-aquecido (TE) adicionado no centro da coluna e este ficou em repouso por 15-30 min. Após incubação, as colunas foram centrifugadas durante 2 min a 13000 rpm.

A concentração de cada amostra foi realizada em nanodrop e as amostras foram analisadas em gel de agarose 1%.

### **3.8 Obtenção do scFv e do vetor pPIgLE**

Após transformação dos plasmídeos em bactérias competentes, iniciamos o processo de obtenção do nosso inserto, bem como do vetor pPIgLE. Para isso, realizamos a digestão das amostras utilizando 30 unidades de enzimas SmaI e EcoRI (Invitrogen®) para 2 $\mu$ g de DNA em um volume final de 50 $\mu$ L. Incubamos as amostras por 16 horas a 37°C. Posteriormente, os produtos digeridos foram analisados em eletroforese de gel de agarose 1%.

### **3.9 Eluição dos fragmentos de DNA digeridos**

Os fragmentos de DNA digeridos com enzimas de restrição separados em eletroforese de gel de agarose foram recortados do gel e coletados em microtubos para purificação do DNA por meio do kit Wizard SV gel and PCR clean up System (Promega).

### **3.10 Ligação dos fragmentos de DNA digeridos**

Após eluição do nosso inserto scFv e do vetor pPIgLE, os mesmos foram ligados utilizando 1  $\mu$ L de Taq DNA ligase (Invitrogen®) e na proporção de 3:1 respectivamente. A ligação foi incubada por 18 horas a 37° C e posteriormente, a eficiência da ligação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%.

### **3.11 Leveduras *Pichia pastoris***

A linhagem SMD1168 (Invitrogen):  $\square_{pep4}::URA3 \square_{kex1}::SUC2his4ura3$  (CEREGHINO E CREGG, 2000) com fenótipo His<sup>-</sup>Mut<sup>+</sup>, foi utilizada para a expressão do

scFv. As leveduras foram gentilmente cedidas pela Profa. Irene Soares, do laboratório de Parasitologia da FCF-USP.

### **3.12 Preparo de células eletrocompetentes de *Pichia pastoris***

Uma colônia de *Pichia pastoris* da linhagem SMD1168 foi inoculada em 5mL de meio YPD e incubada a 30C durante 16 horas, sob agitação a 200 rpm. A seguir 0,1 a 0,5 mL do pré-inóculo foi inoculado em 500mL de meio YPD. A cultura foi incubada nas mesmas condições acima até a cultura atingir uma leitura de densidade óptica a 600nm de 1,3 a 1,5. As células foram então centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4° C, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuscitado em 250 mL de água gelada estéril. A centrifugação foi repetida 2 vezes, sendo que na primeira o sedimento foi ressuscitado em 125 mL de água gelada estéril e na segunda em 20 mL de sorbitol (SIGMA) 1M estéril e gelado. As células foram centrifugadas novamente e ressuscitadas em 400uL de sorbitol (SIGMA) estéril gelado. As células eletrocompetentes então foram aliquotadas em volume de 80uL em microtubos estéreis.

### **3.13 Transformação e expressão do scFv**

O DNA plasmidial (pPIgLE-scFv) foi digerido com uma enzima que possui sítio único no vetor (SalI - Invitrogen®) com o objetivo de linearização do material genético. A digestão do vetor foi realizada em banho-maria a 37° C durante 16 horas e confirmada por eletroforese de gel de agarose 1%. Posteriormente, o plasmídeo linearizado foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100% gelado; 1/10 volume de acetato de sódio 3 M pH 5.2; 60ug de glicogênio e incubado a 20C durante 16 horas. As células eletrocompetentes e o DNA plasmidial precipitado foram submetidos às seguintes condições: 1500 V, 400Ω, 25uF, 10ms em um campo de 7500 V/cm, utilizando o equipamento Gene Pulser II (Biorad). As células transformadas foram semeadas sobre placas contendo meio MD-ágar (Minimal Dextrose Medium) e mantidas a 30° C até o surgimento das colônias isoladas.

Posteriormente, a produção do scFv foi realizada através da expressão em levedura metilotrófica *P. pastoris*, descrita anteriormente. As leveduras foram transformadas com o vetor de expressão pPIGLE (cedidas pela Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão da Universidade de Brasília – UnB) contendo a seqüência de DNA desejada. Estas células foram incubadas em 200 mL de meio BMGY (Buffered Complex Glycerol Medium), a 30° C sob agitação (200rpm), até a cultura atingir densidade óptica de 600 nm de 2.0 a 6.0.

A cultura foi submetida à centrifugação (3000g/5 minutos/temperatura ambiente), o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200 mL de meio BMMY (Buffered Complex Methanol Medium) e incubadas à 20° C sob agitação constante (200rpm) por 3 dias. O metanol (1%), um indutor de expressão foi adicionado à cultura a cada 24 horas, assim como, o inibidor de serino-protease (PMSF) (1mM).

Posteriormente, o sobrenadante de cultura foi filtrado em membranas de 0.45µm e 0.25 µm e então, submetido ao processo de purificação.

### **3.14 Análise da expressão do scFv**

A expressão do scFv foi analisada em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (LAEMMLI, 1970). O gel separador foi preparado a 12% e a polimerização catalisada pela adição de persulfato de amônia 10% e de Temed. Em seguida, o gel de empacotamento a 3% foi vertido, tendo sua polimerização catalisada por 10% de persulfato de amônia e Temed. Uma vez despejado o gel de empacotamento, colocamos um pente para a formação dos poços e após a polimerização, o gel foi acoplado ao sistema de eletroforese. As amostras foram preparadas adequando-se o volume de amostra ao volume de tampão de amostra 10x concentrado, aquecidas a 95°C durante 5 minutos e aplicadas sobre o gel. Após a corrida do gel a 140V por 1h30min, este foi submetido à coloração por prata, de acordo como descrito por Ansorge em 1983.

### **3.15 Purificação da proteína (scFv)**

A purificação da proteína foi feita de acordo com o protocolo da Thermo Scientific: HisPur™ Ni-NTA Spin Columns, 2203.3. ([https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011699\\_HisPur\\_NiNTA\\_SpinColumn\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011699_HisPur_NiNTA_SpinColumn_UG.pdf)).

Primeiramente, a coluna é equilibrada à temperatura ambiente. A amostra então é preparada com extrato de proteína com volume igual ao tampão de equilíbrio (Fosfato de Sódio 20 mM, Cloreto de Sódio 300 mM (PBS) com Imidazol 10 mM - pH 7,4), que foi ajustado a fim de ser duas vezes maior que o volume da resina. Para a retirada do tampão de armazenamento, a coluna é centrifugada a uma rotação de 700 g durante 2 minutos.

Após a centrifugação, a coluna é equilibrada com tampão de equilíbrio em volume duas vezes maior ao de resina. Novamente, a coluna é centrifugada a uma rotação de 700 g por 2 minutos. O extrato de proteína é adicionado a coluna, e deixada em um agitador durante

30 minutos à temperatura ambiente. Após os 30 minutos, a resina é lavada com tampão de lavagem (PBS com 25 mM de imidazol; pH 7,4), e centrifugada por 2 minutos a 700 g. Este passo é repetido por 2 vezes.

A proteína então é eluída, a partir da resina marcada com HIS, adicionando o tampão de eluição (PBS com 250 mM de imidazol; pH 7,4). Centrifuga-se novamente durante 2 minutos a 700 g. Este passo também é repetido por duas vezes. E cada fração é recolhida em tubos eppendorf de forma separada.

### **3.16 Quantificação de proteína**

As determinações protéicas foram realizadas segundo o método proposto por Bradford (1976), que utiliza “Comassie Brilliant Blue” (CBB) G-250 (Sigma) como reativo e albumina bovina (BSA) 1,0mg/mL como padrão. As amostras foram analisadas em triplicata e a concentração de proteína determinada através da equação da reta resultante da curva-padrão.

### **3.17 Produção das nanocápsulas**

A preparação do complexo metálico de nanocápsulas multiparedes (MCMN), bem como sua conjugação com o scFv foram produzidas e cedidas pelo Professor André Correa Amaral, Professor Adjunto III de Nanobiotecnologia e Biologia Molecular na Universidade Federal de Goiás.

Os polímeros pré-formados foram primeiro dissolvidos em diclorometano com 50mg de PLA e 50 mg de PGA (proporção 50:50). A esta solução orgânica foi adicionada poli-vinil álcool (PVA, 1%). Posteriormente, foi realizado o encapsulamento do scFv deixando as moléculas em concentrações determinadas de 20 e 40 ng/mL.

### **3.18 Terapia de camundongos infectados com a cepa virulenta *Pb18***

25 animais foram infectados com uma suspensão contendo  $1 \times 10^6$  células/mL de leveduras viáveis de *Pb* contidas em 50  $\mu$ L de *PBS*. O procedimento foi realizado com os animais sob efeito de anestésico, seguindo o esquema: Xilazina (pré-anestésico), Cetamina (anestésico) e *PBS* na proporção de 3:3:4. Quando os animais já estavam insensíveis à dor foi feita uma pequena incisão longitudinal na pele do pescoço, e a traqueia exposta para a infecção. Após inoculação, a incisão foi suturada e os animais foram colocados sob uma fonte moderada de calor para controlar a hipotermia transitória produzida pela anestesia, até acordarem.

Os animais foram então separados em 5 grupos, cada um contendo 5 animais, de acordo com os tratamentos utilizados.

Após 7, 15 dias e 21 dias, os grupos foram tratados pela via intramuscular com os seguintes tratamentos: 1) 50µL de *PBS* 1x estéril, 2) scFv recombinante na concentração de 20 ng/mL 3) Nanocápsula vazia na concentração de 20 ng/mL, 4) scFv recombinante conjugados à nanocápsulas em concentração de 20ng/mL, 5) scFv recombinante conjugados à nanocápsulas em concentração de 40 ng/mL.

### 3.19 Unidades formadoras de colônias (UFC)

O ensaio de UFC consiste no crescimento de leveduras de *Pb* em meio sólido, a partir dos pulmões macerados. Os pulmões dos animais são retirados, ressuspensos em 1 ml de *PBS* 1x estéril, e macerados. Deste macerado, são retirados 200 µL para cada placa de petri contendo meio BHI suplementado com soro equino e 5% de filtrado de cultura do isolado 192 de *Pb*, como fonte de fator de crescimento do fungo, conforme descrito por Castañeda e colaboradores em 1988 e Singer-Vermes e colaboradores, em 1992. Após o plaqueamento, contamos as colônias durante 3 semanas, para obtermos a quantidade de colônias por grama de órgão.

### 3.20 Perfil de células ativadas no pulmão de camundongos infectados e tratados com scFv recombinante conjugado às nanocápsulas

Para analisarmos o fenótipo de células ativadas em camundongos infectados e tratados, os pulmões foram retirados e os macrófagos e células dendríticas, foram ajustadas na concentração de  $1 \times 10^6$  e marcadas com os seguintes anticorpos fluorescentes: anti-CD11c, antiF4/80 (fluorescências e clones vide Quadro 1). Foi realizada análise por citometria de fluxo (FacsCanto) e os dados gerados analisados com auxílio de software FlowJo (TREE STAR, Inc.USA). Foram analisados 50.000 eventos.

Anticorpo	Fluorescência	Clone
CD11c	FITC/PE	N418
F4/80	FITC	A3-1

**Quadro 1.** Relação de anticorpos para fenotipagem de células dendríticas e macrófagos após tratamento, fluorescências e seus respectivos clones.

### 3.21 Dosagem de citocinas

Para caracterizarmos o tipo de resposta imune induzida (Th1/Th2/Th17) nos camundongos infectados e tratados, os pulmões destes animais foram retirados, macerados em 1mL de solução *PBS* 1x estéril e então, o sobrenadante recolhido e as citocinas IL-10, IL-12, IL-4, IL-17, IFN- $\gamma$  dosadas, de acordo com instruções do fabricante (eBioscience, Inc.)

### 3.22 Preparação de Antígeno livre da parede do fungo (CFA) de *Pb*

Para a preparação de Antígeno livre da parede do fungo (CFA) de *Pb*, o fungo foi dissolvido em 10 mL de *PBS* e agitado em vortex. Posteriormente, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm, e então, o sobrenadante foi recolhido para obtenção do antígeno CFA e a dosagem realizada pelo método de Bradford.

### 3.23 Dosagem de imunoglobulinas (IgG)

O mesmo modelo de tratamento utilizado para análise de citocinas foi empregado para a dos isotipos IgG1 e IgG2a, porém para este ensaio, os soros dos camundongos foram obtidos no 20º dia após a infecção.

Os isotipos, foram dosados na presença de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CFA, diluído com o tampão carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,795 g,  $\text{NaHCO}_3$  em 500 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada). As placas foram incubadas overnight em temperatura ambiente (TA). Após o tempo de incubação, realizamos 3 lavagens com *PBS*-Tween 20, seguido da adição de 200  $\mu\text{L}$  da solução de bloqueio *PBS*-leite-BSA (*PBS* + 5 % de leite Mólico + 2,5 % BSA). Incubamos a 37 °C por 2 horas. Posteriormente desprezamos a solução de bloqueio e, sem lavar as placas, adicionamos o soro dos animais na proporção de 1:25, sendo as todas diluições feitas em *PBS*-leite-BSA. Incubamos a TA por 1 hora. Em seguida lavamos as placas 3 vezes com *PBS*-Tween 20 e adicionamos 50  $\mu\text{L}$  do anticorpo conjugado previamente titulado (anti mouse IgG-peroxidase) e diluído em *PBS*-leite-BSA. Incubamos a TA por 1 hora, e após a incubação, lavamos as placas 3 vezes com *PBS*-Tween 20 e adicionamos 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$  da solução revelação (1 mg/mL de OPD em tampão citrato-fosfato –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3,68 g, ácido cítrico 1,16 g,  $\text{H}_2\text{O}$  200 mL, ajustar o pH para 4,8). Incubamos por 15 minutos no escuro, posteriormente paramos a reação com 50  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4N. A leitura foi realizada no leitor de ELISA com o filtro de 492 nm.

### **3.24 Análise estatística**

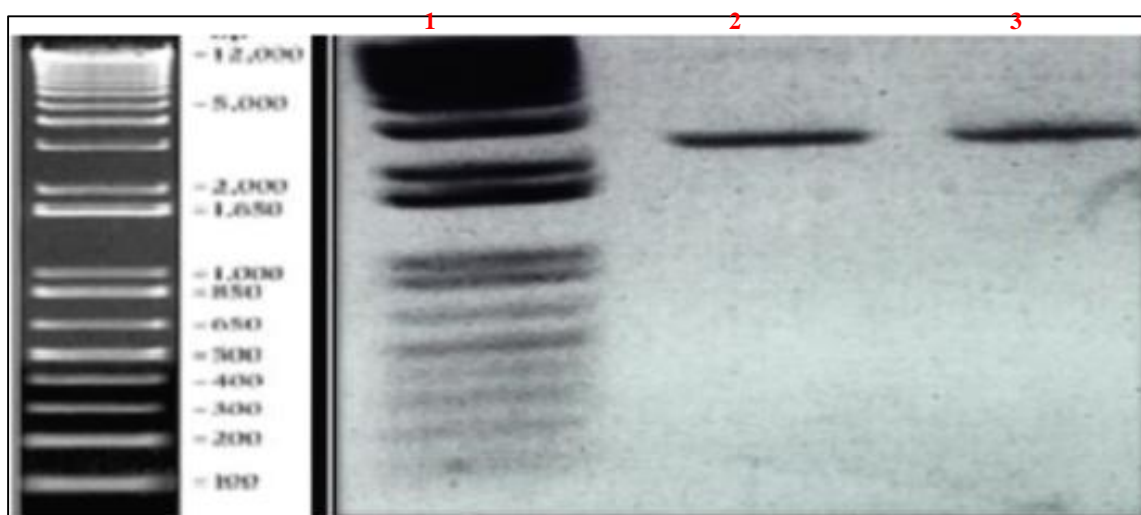
A análise estatística aplicada aos resultados foi feita através de One-Way ANOVA, e múltiplas comparações serão feitas pelo teste de Tukey (ZAR, 1984).

## 4 Resultados

### 4.1 Transformação do pMAC/PS-scFv e pPIgLEZ22 em bactérias *Escherichia coli* competentes

Nosso laboratório já possuía os vetores pMAC/PS-scFv e pPIgLEZ22 de trabalhos realizados anteriormente pelo grupo, mas para aumentarmos a quantidade de material antes de iniciarmos o processo de ligação no vetor de expressão em leveduras com o nosso inserto scFv, transformamos as duas construções (pMAC/PS-scFv e pPIgLEZ22) em bactérias *E. Coli* DH5  $\alpha$  competentes. Em ambas transformações, as bactérias competentes receberam os vetores por choque térmico e foram então, incubadas para o crescimento bacteriano.

Como mostrado na figura 4, o processo de transformação foi eficiente e dessa forma, conseguimos aumentar a quantidade dos vetores.



**Figura 4: Plasmídeos purificados.** Os plasmídeos e o vetores foram transformados em bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ , por choque térmico. Coluna 1: Marcador molecular 1KpPlus DNA ladder (Invitrogen®); Coluna 2: plasmídeo pMAC/PS-scFv; Coluna 3: plasmídeo pPIgLE-Z22.

### 4.2 Transformação e digestão dos plasmídeos pPIgLE Z22 e do pMAC/PS-scFv

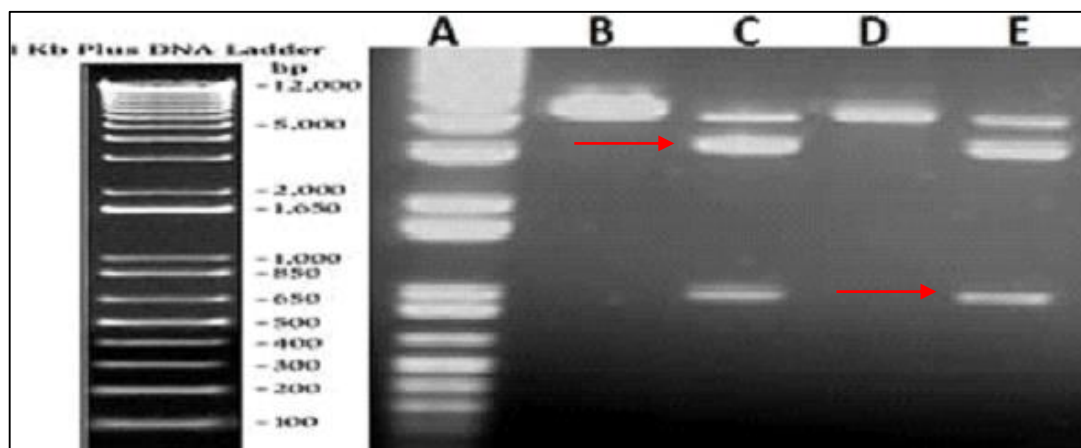
O plasmídeo pMAC/PS, o qual possui o nosso inserto scFv é um vetor de célula de mamífero. Então, inicialmente, realizamos a digestão deste plasmídeo com SmaI e EcoRI para obtermos somente o nosso inserto, o scFv. Posteriormente, digerimos o vetor pPIgLE Z22 com as mesmas enzimas de restrição, para obtermos somente o plasmídeo com promotor para leveduras, sem o scFv irrelevante, o Z22. Esse processo foi necessário para que pudéssemos inserir o nosso scFv no vetor de expressão em leveduras. Dessa forma, foi possível obter a construção pPIgLE-scFv. A figura 5 mostra que o processo de digestão com as enzimas



funcionou para as duas construções. Podemos observar utilizando gel de agarose 1% que em C e E ocorreu eficiência da digestão tanto para o pMAC/PS-scFv como para pPIgLEZ22, quando comparamos com o material intacto, sem digestão, como mostrado em B e D. Ressalta-se que, embora os plasmídeos pMAC e pPIgLE apresentem o mesmo tamanho, possivelmente o tempo de corrida das amostras não foi o suficiente no gel, resultado em proporções aproximadas, e uma terceira banda.

Após digestão, realizamos a técnica de freeze-squeeze para obtenção do plasmídeo e do inserto de interesse. Para isso, as bandas correspondentes foram cortadas e incubadas a -50C por 18 horas. Posteriormente, utilizando colunas de extração de DNA em agarose, obtivemos separadamente tanto o pPIgLE vazio como o inserto scFv.

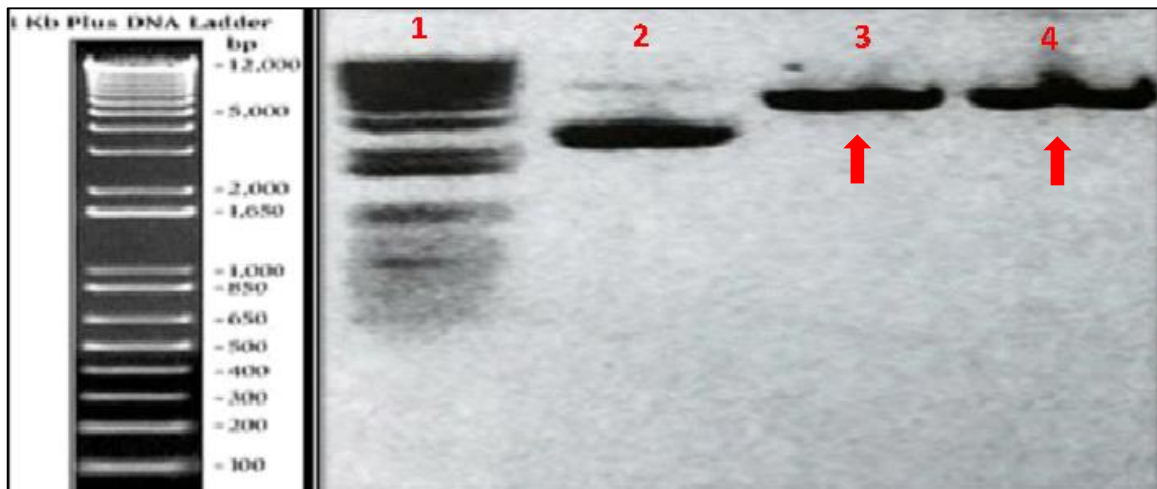
Com a obtenção tanto do plasmídeo como do inserto, realizamos a ligação dos mesmos utilizando Taq DNA ligase.



**Figura 5-** Eletroforese em gel de agarose 1% com a digestão do vetor pPIgLE e do inserto pMAC/PS-scFv com as enzimas *Sma*I e *Eco*RI (Invitrogen®). Coluna A: Padrão 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen®), Coluna(B) pPIgLEZ22 intacto, Coluna C: pPIgLEZ22 digerido, Coluna D: pMAC/PS-scFv intacto e coluna E: pMAC/PS-scFv digerido. A seta na coluna B indica a porção referente ao vetor linearizado que foi utilizado na reação de ligação com o inserto scFv. A seta na coluna E, demonstrando a liberação do inserto.

### 4.3 Digestão em larga escala do pPIgLE-scFv

Para o processo de eletroporação da ligação pPIgLE-scFv foi necessário realizarmos o processo de linearização do vetor, utilizando a enzima *Sal*I. Para isso, iniciamos a digestão em pequena escala, utilizando 400ng de amostra, para checar se a nossa amostra não estava degradada, para então, realizarmos a digestão em larga escala (Figura 6). Como mostra a, notamos a presença de uma banda, mais alta do que a do plasmídeo intacto, confirmando assim, a digestão, deixando dessa forma a amostra pronta para ser eletroporada em leveduras de *P. pastoris*.

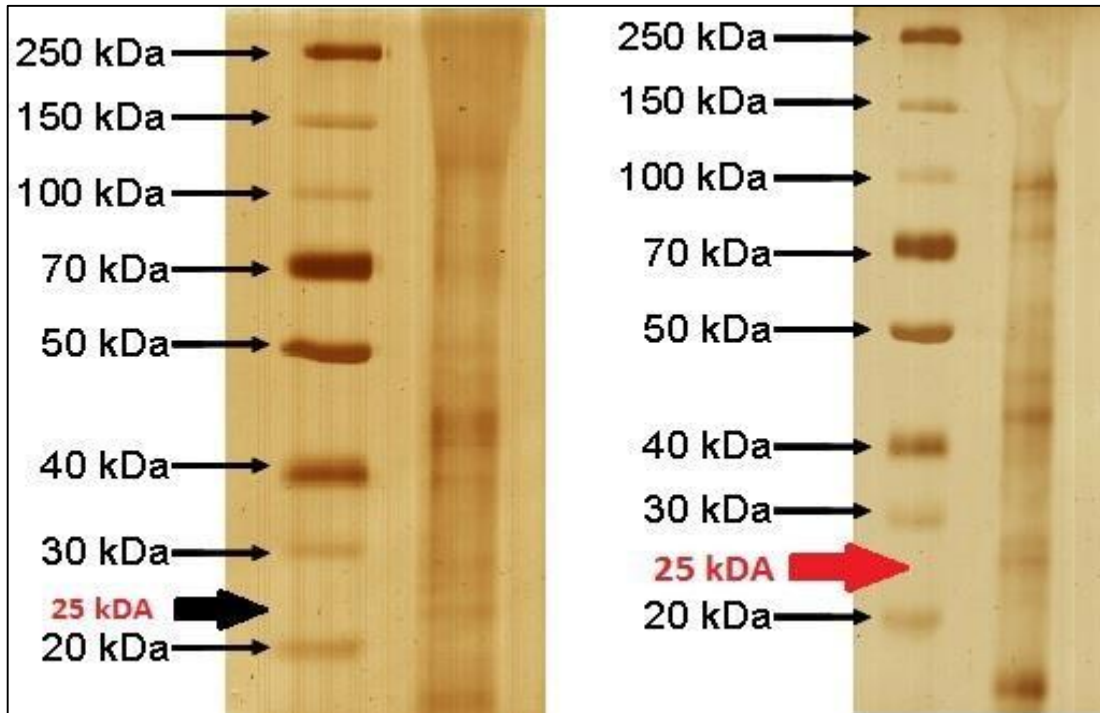


**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 1% com a digestão, em larga escala, do vetor pPigLE e do scFv recombinante com a enzima de restrição Sal I (Invitrogen®). Coluna 1: Marcador molecular 1KpPlus DNA ladder (Invitrogen®); Coluna 2: Vetor pPigLE intacto, sem digestão; Colunas 3 e 4: 400 ng do vetor digerido com a enzima Sal I. A seta indica a porção referente ao vetor linearizado.

#### 4.4 Perfil eletroforético do scFv recombinante

Inúmeros fragmentos de anticorpos, principalmente scFv são expressos em *E.coli*. Porém, esse fragmento fica retido na bactéria, no periplasma, trazendo como consequência o baixo rendimento de scFv ao ser purificado. (Freyre *et al.*, 2000; Damasceno *et al.*, 2004). De acordo com Freyre e colaboradores (2000), a produção do scFv em *Pichia pastoris* demonstrou ser mais elevada, podendo chegar a taxas de produção em gramas por litro de cultura.

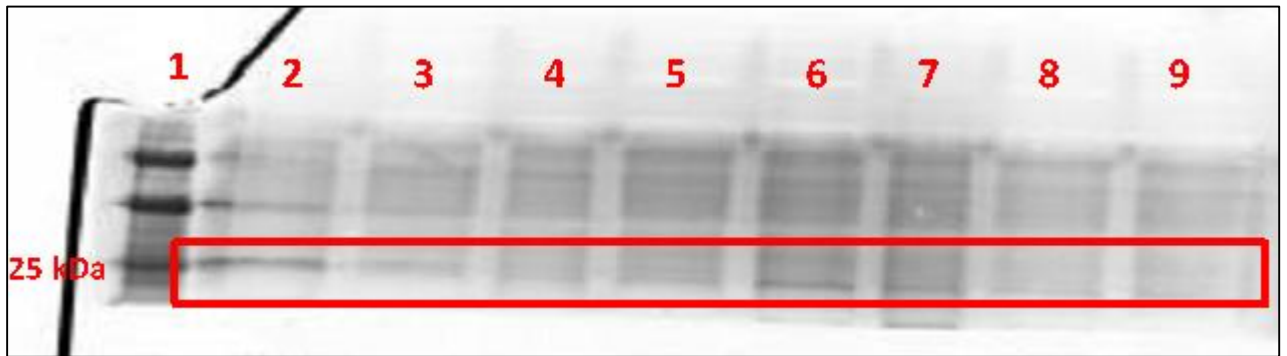
Tendo, neste trabalho, sido utilizada a levedura como forma de expressão do nosso inserto de interesse, a figura 7 demonstra que houve de fato expressão, e o perfil protéico do scFv, comparado com um padrão de perfil protéico variando de 20 à 250 kDa.



**Figura 7: Perfil eletroforético do scFv.** O scFv retirado do sobrenadante de cultura de *P.pastoris* foi analisado por SDS-PAGE 10% corado com prata. As setas indicam a banda correspondente a proteína scFv com um peso molecular de aproximadamente 25 kDa. Padrão de peso molecular: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific®).

#### 4.5 Eletroporação e expressão do scFv recombinante

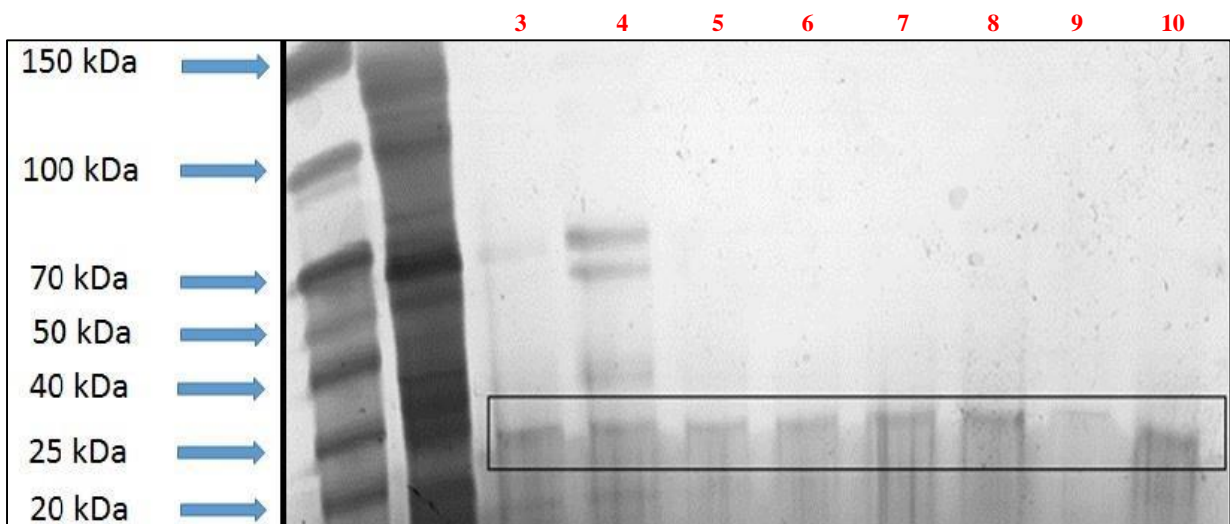
Após processo de purificação, a construção pPIgLE-scFv foi eletroporada em leveduras de *P. Pastoris*. Posteriormente, realizamos a indução da expressão do nosso inserto, o scFv. A eficiência de expressão da nossa proteína a partir de 24 horas e de duas amostras diferentes foi analisada por gel SDS-PAGE. O resultado mostra a expressão do nosso inserto, na altura aproximada de 30kDa, como mostra a figura 8, nos diferentes tempos analisados.



**Figura 8: Expressão do scFv recombinante.** Análise do gel de SDS-PAGE 10%, corado com prata, do sobrenadante de cultura das amostras de expressão com diferentes tempos de expressão. Coluna 2 a 5: sobrenadante de cultura do clone 1, que continham o vetor pPIgLE-scFv em diferentes tempos de indução. Colunas 6 – 9: sobrenadante de cultura do clone 2 contendo o vetor pPIgLE-scFv em diferentes tempos de indução. Padrão de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen®). Coluna 2: expressão do clone 1 no tempo de 24h; Coluna3: expressão do clone 1 no tempo de 48h; Coluna 4: expressão do clone 1 no tempo de 72 horas; Coluna 5: expressão do clone 1 no tempo de 96 horas; Coluna 6: expressão do clone 2 no tempo de 24 horas de indução; Coluna 7: expressão do clone 2 no tempo de 48 horas de indução; Coluna 8: expressão do clone 2 no tempo de 72 horas; Coluna 9: expressão do clone 2 no tempo de 96 horas;

#### 4.6 – Purificação da proteína (scFv recombinante)

A purificação da proteína foi feita de acordo com o protocolo da Thermo Scientific: HisPur™ Ni-NTA Spin Columns, 2203.3. Nosso resultado (FIGURA 9), demonstra que a proteína encontra-se purificada, como podemos observar nas colunas de 3 a 10, apresentando o tamanho aproximado de 30kDa.



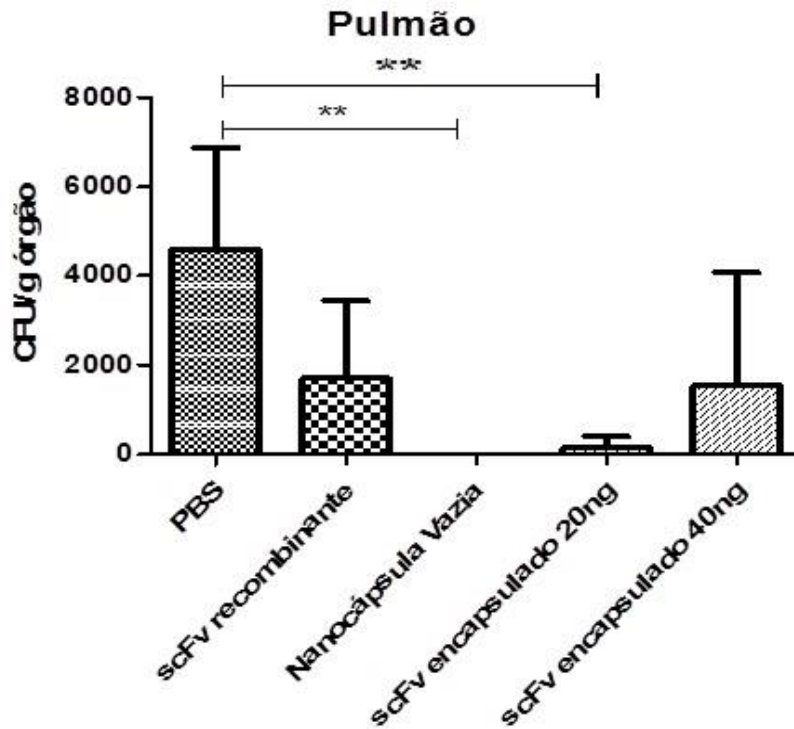
**Figura 9 – Purificação do scFv pelo método de cromatografia de afinidade em coluna de Níquel** - Frações eluídas com gradiente de Imidazol entre 20 e 500mM. As coluna 3 a 10 representam o scFv purificado após 96 horas de cultura de *P.pastoris*. As marcações indicam o scFv com aproximadamente 25 KDa. Coluna 1 e 2: Padrão de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen®).

Após a purificação da proteína, fizemos a quantificação da proteína pelo método de Bradford, através da curva padrão de BSA.

#### **4.7 - Imunização com scFv encapsulado confere proteção em modelo de Paracoccidioidomicose experimental**

Para analisarmos a eficiência do scFv recombinante encapsulado ou não no modelo de PCM experimental, os camundongos foram infectados (5 animais por grupo) pela via intratraqueal, e após 7, 15 dias e 21 dias, tratados pela via intravenosa com scFv recombinante conjugados à nanocápsulas em concentrações 20ng/mL e 40ng/mL.

Nossos resultados demonstram que ocorreu uma diminuição significativa da carga fúngica pulmonar quando os camundongos foram tratados com 20 ng/ml do scfv encapsulado. No entanto, não observamos essa diferença quando aumentamos a concentração da proteína (40ng/mL) em relação aos animais tratados com *PBS* 1x estéril. Ainda, foi possível observar que ocorreu diferença significativa também quando comparamos os grupos controle *PBS* 1x estéril e o nanocápsula vazia. (Figura 10).

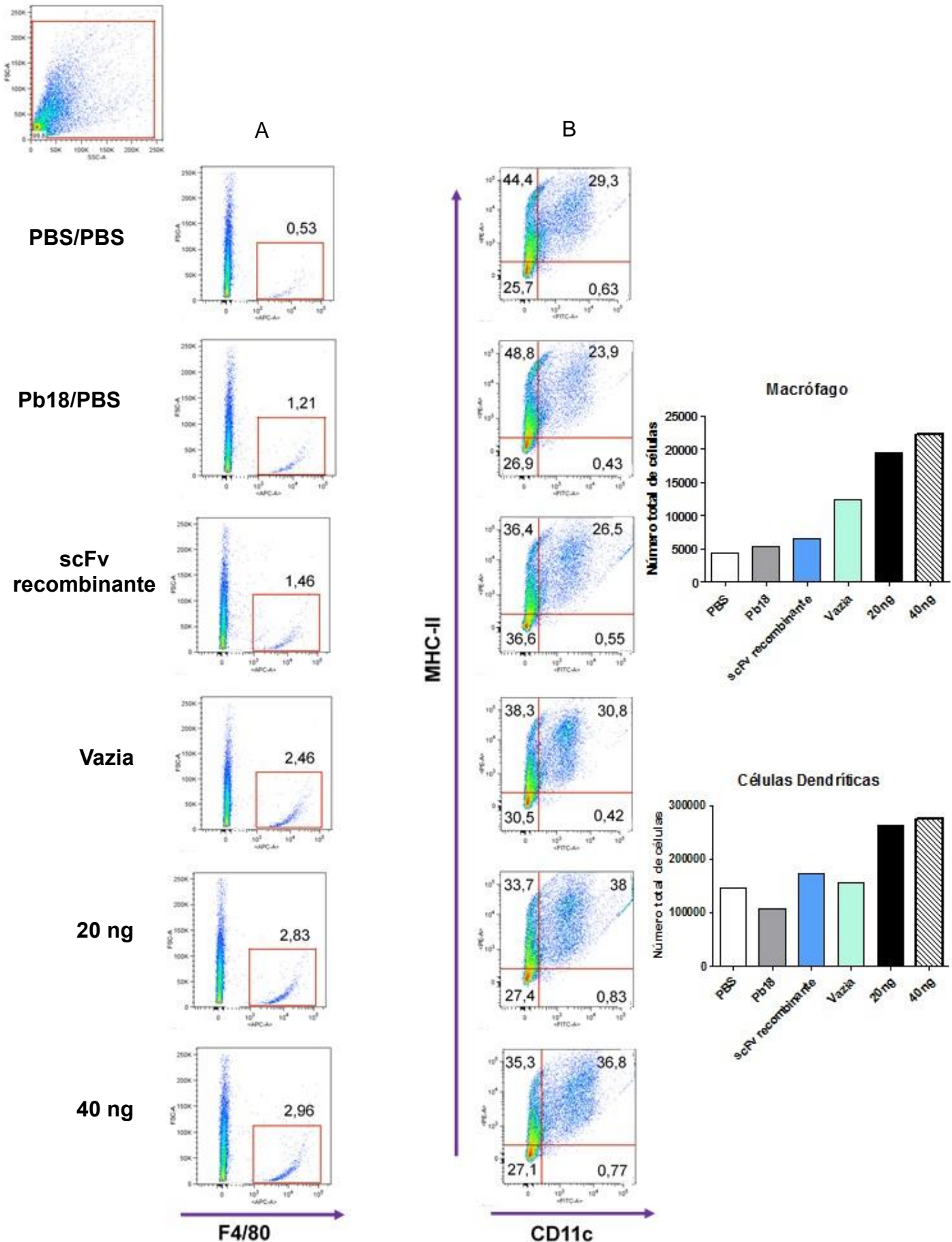


**Figura 10. Imunização com scFv confere proteção em modelo de Paracoccidioidomicose.** Unidades formadoras de colônias (CFU) nos pulmões (de camundongos BALB/c infectados com *Pb18* e tratados com *PBS*, scFv recombinante, nanocápsula vazia, scFv encapsulado concentração de 20ng/mL e scFv encapsulado 40ng/mL nos dias 14 e 21. \*\* $p < 0.0001$ , do grupo tratado com nanocápsula vazia em relação ao controle *PBS*. Há significância entre o grupo tratado com scFv recombinante 20ng/mL e o grupo controle *PBS* 1x estéril.

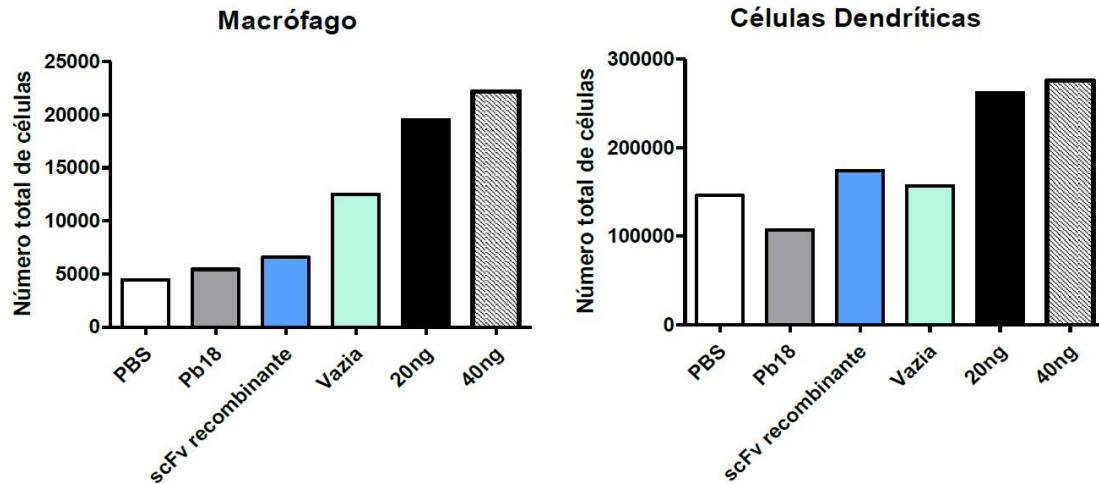
#### 4.8 - Perfil de células ativadas no pulmão de camundongos infectados e tratados com scFv conjugado às nanocápsulas

Para analisarmos o fenótipo de células ativadas em camundongos infectados e tratados, os pulmões foram retirados e os macrófagos e células dendríticas, foram analisadas. Para isto, células totais foram marcadas com anti-F4/80, anti-CD11c e como mostra o histograma na figura 11, observamos aumento de células duplo positivo da população de DCs  $CD11c^+$ , e de macrófagos  $F4/80^+$  nos animais imunizados com scFv recombinante encapsulado tanto na concentração de 20ng/mL, quanto na concentração de 40ng/mL, em relação aos grupos controles.

Os gráficos, ao lado do histograma, representam dentro do número total de células dendríticas marcadas ( $2,5 \times 10^4$ ), a porcentagem de células  $CD11c^+$  recrutadas em cada tratamento. E estas, representaram em média 91,5 % das células totais nos grupos tratados com scFv encapsulado, enquanto nos grupos controle, as DCs representam, em média, 47,7% das células totais (FIGURA 11C)



**Figura 11 - Imunização com scFv encapsulado aumenta população de DCs CD11c e Macrófagos F4/80 nos pulmões.** Camundongos (5 por grupo) foram imunizados pela via intramuscular em diferentes grupos e após 28 dias de infecção, as células foram marcadas com (A) anti-CD80 e (B) anti-CD11c. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo software FlowJo.

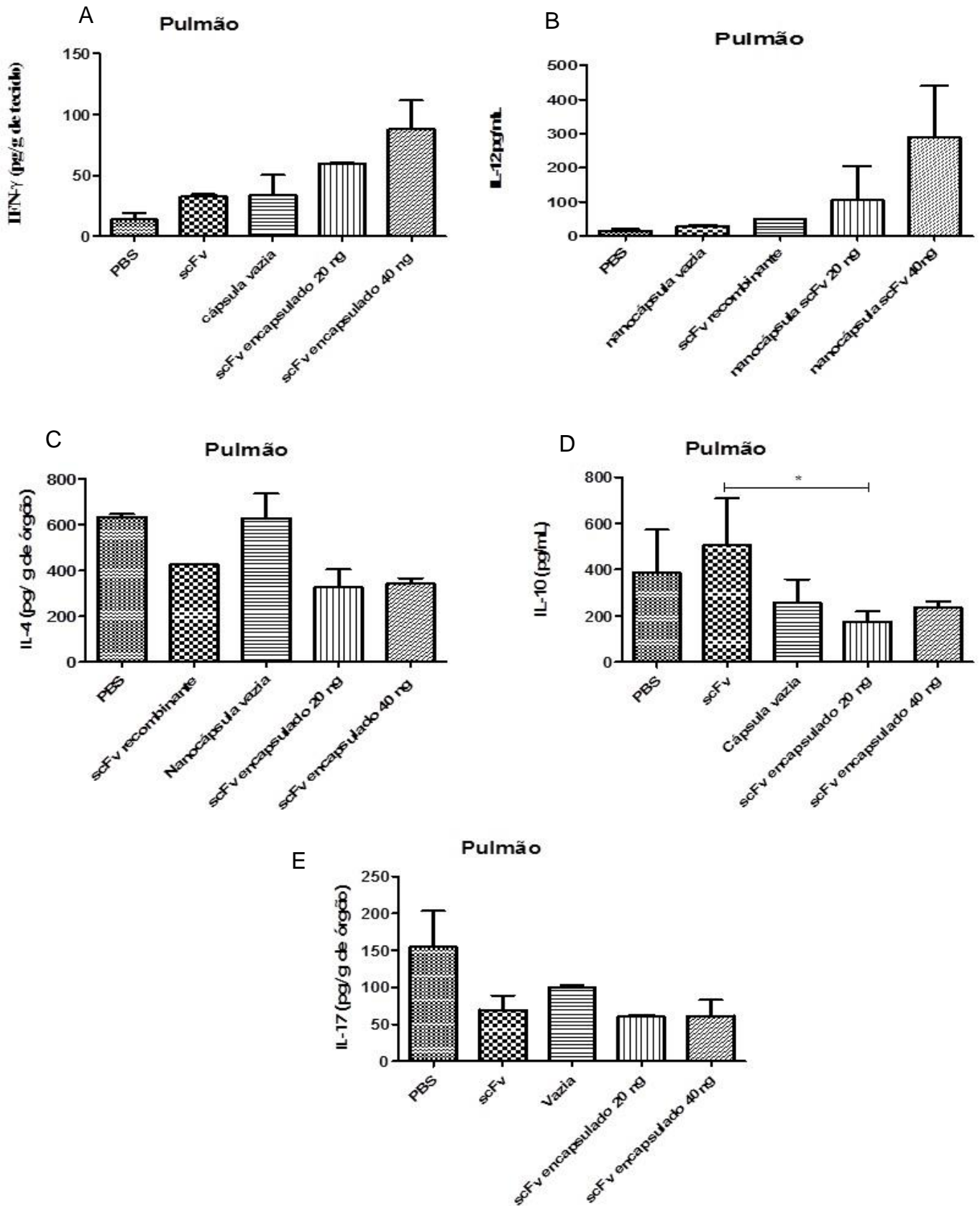


**Figura 11C - Imunização com scFv encapsulado aumenta população de DCs CD11c e Macrófagos F4/80 nos pulmões.** Camundongos (5 por grupo) foram imunizados pela via intramuscular em diferentes grupos e após 28 dias de infecção, as células foram marcadas com (A) anti-CD80 e (B) anti-CD11c. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo software FlowJo.

#### 4.9 - Dosagem de citocinas

As citocinas são importantes na modulação da resposta imune gerada na PCM experimental, assim, dessa forma, analisamos as principais citocinas envolvidas nesse processo, como IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4, IL-10 e IL-17. Quando os camundongos foram infectados e tratados com scFv encapsulado nas concentrações de 20ng/mL e 40ng/mL, observamos aumento da produção de IFN- $\gamma$  e IL-12 (Figuras 12A e 12B, respectivamente) quando comparados aos grupos controles. Já, quando analisamos a produção de IL-4, IL-10 e IL-17, observamos diminuição destas citocinas, sendo que a IL-10 diminuiu de maneira significativa quando comparado com os controles, como mostram as figuras 12C, 12D e 12E



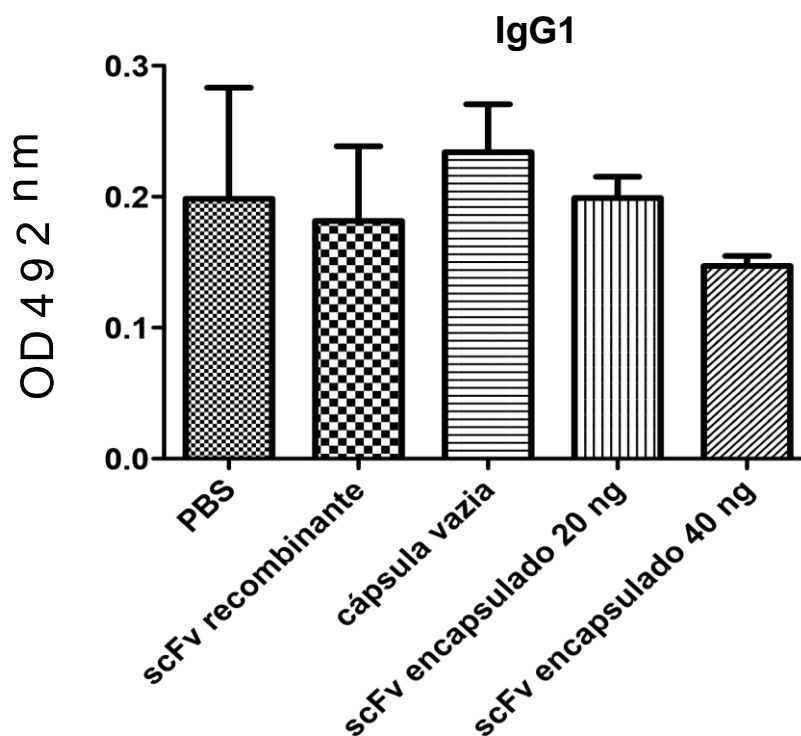


**Figura 12 - Terapia com scFv encapsulado modula produção de citocinas pulmonares.** BALB/c foram infectados via intratraqueal com  $1 \times 10^6$  leveduras do *Pb18*. Após 7, 14 e 21 dias, os grupos foram tratados com PBS, scFv recombinante, Nanocápsula vazia, scFv encapsulado 20ng/mL e scFv encapsulado 40ng/mL. Após 7 dias da última imunização, os pulmões foram retirados, e o sobrenadante foi obtido para análise de citocinas, por ELISA.

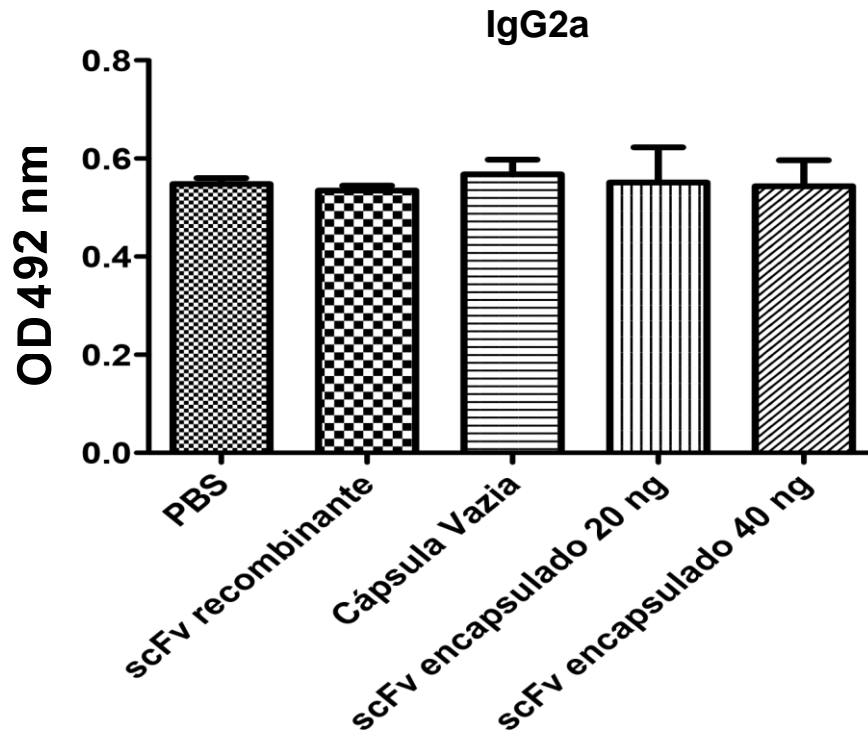
#### 4.10 – Terapia com scFv encapsulado induz produção de anticorpos

Para avaliarmos se a construção do scFv quando encapsulado era capaz de induzir uma resposta humoral específica, analisamos os níveis de imunoglobulinas totais do tipo IgG1 e do subtipo IgG2a. Para esta análise, camundongos BALB/c foram infectados pela via intratraqueal com a cepa *Pb18* e, posteriormente, receberam três doses (7°, 14° e 21° dia) de diferentes tratamentos: *PBS*, scFv recombinante, cápsula vazia, scFv recombinante encapsulado nas concentrações de 20ng/mL e 40ng/mL.

Sete dias após a última imunização, os soros destes animais foram obtidos e a dosagem de IgG realizada na presença de 4µg de antígeno livre da parede do fungo (CFA). Analisando os resultados, observamos que as IgGs analisadas não apresentam diferenças significativas em relação aos controles tratados com *PBS* 1x estéril e com a cápsula vazia.



**Figura 13 - Produção do isótipo IgG1 nos camundongos.** Camundongos BALB/c (5 por grupo) foram infectados pela via intratraqueal com  $1 \times 10^6$  leveduras do *Pb18*. Após 6, 13 e 20 dias, os grupos foram tratados *PBS*, scFv recombinante, cápsula vazia, scFv recombinante encapsulado 20ng/mL, e scFv recombinante encapsulado 40ng/mL.



**Figura 14 - Isotipos de IgG2a.** Camundongos BALB/c (5 por grupo) foram infectados pela via intratraqueal com  $1 \times 10^6$  leveduras do *Pb18*. Após 6, 13 e 20 dias, os grupos foram tratados com *PBS*, scFv recombinante, cápsula vazia, scFv recombinante encapsulado 20ng/mL, e scFv recombinante encapsulado 40ng/mL. Os soros desses animais foram obtidos um dia antes a cada imunização e após 7 dias da última para análises de IgG2a por ELISA. Os ensaios foram realizados na presença de  $4 \mu\text{g}$  de CFA.

## 5 - DISCUSSÃO:

Embora considerada a terceira maior causadora de morte entre as doenças infecciosas crônicas, segundo Wanke e Aidê (2009), a PCM não é uma doença de notificação compulsória. Além disso, os tratamentos com antifúngicos tradicionais nem sempre são eficientes, uma vez que, o *Pb* é resistente à maioria das drogas antifúngicas, inclusive aos sulfamídicos, o que complica ainda mais o tratamento (MENDES, 1994).

Grande parte dos pacientes interrompem o tratamento contra a PCM antes mesmo da alta médica, uma vez que estes são muito longos, demorando, em certos casos, mais que dois anos (MARQUES *et al.*, 2006).

Diversos trabalhos objetivam formas mais eficazes para o combate a esta doença, dentre eles, o scFv recombinante é uma terapia com grande potencial. Em 2011, nosso grupo de pesquisa (FERREIRA *et al.*, 2011), em camundongos imunizados pela via intramuscular com o scFv transfectados em células dendríticas, demonstrou que estas células foram capazes de apresentar tal proteína para as células dos linfonodos inguinais e poplíteos, bem como foram capazes de induzir linfoproliferação antígeno-específica de células T CD4<sup>+</sup>, e que camundongos infectados (i.t.) com *Pb* e tratados com DC-pMAC/PS-scFv deu-se uma diminuição da carga fúngica pulmonar, mostrando que tal construção gênica tem um grande potencial no tratamento da PCM.

Visto a eficiência de DC-pMAC/PS-scFv, na intenção de melhorar a resposta imune, resolvemos produzir a molécula scFv na sua forma recombinante, para a que mesma fosse inserida em uma nanocápsula para análise da resposta imune em modelo murino de PCM.

Assim, primeiramente, para obtermos a molécula do scFv recombinante, usamos para expressá-lo a levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. A utilização das leveduras para expressão de proteínas heterólogas tem atraído a atenção devido a facilidade de manipulação genética e suas características de crescimento, que permitem o cultivo deste microrganismo em escala industrial. (SMITH, *et al.*, 1985).

Para a expressão do scFv, de acordo com Wan *et al.* (2008), a *P. pastoris* apresenta vantagens em relação a *E.coli* por apresentarem proteínas solúveis secretadas para o meio de cultura através de uma sequência sinal fator alfa, e pelo fato de que as condições redutoras do citoplasma da bacterina não permitem a formação de pontes dissulfeto que são de extrema importância para a estabilidade da molécula de scFv (WORN; PLUCKTHUN, 2001), mas que ocorrem na levedura devido a capacidade de realizar modificações pós-traducionais deste organismo (PATRICK *et al.*, 2005). Kazuma, em 2010, demonstrou em seu trabalho a

expressão do scFv 2C7 fusionado a proteína A em pequena escala. Em nosso trabalho, a expressão proteica teve início 24 horas após a indução, e, 48 horas após foi observada a maior taxa de expressão da proteína.

Após a expressão da nossa molécula de scFv recombinante, e sua associação às nanocápsulas, deu-se início a experimentação animal, e aos tratamentos para obtenção dos resultados a respeito da eficácia da nossa construção em modelo murino da PCM.

Assim, para que pudéssemos avaliar o padrão de resposta imune, infectamos e tratamos os animais em cinco diferentes grupos: PBS, scFv recombinante, nanocápsula vazia, scFv recombinante encapsulado com 20ng/mL e 40ng/mL, e avaliamos a carga fúngica nos pulmões destes animais. A diminuição do CFU encontrado em nossos resultados reflete os resultados encontrados por Tabora *et al.* (1998), que ao identificarem um peptídeo, denominado P10, derivado da gp43 de *Pb* e observaram que esse era capaz de proteger camundongos infectados por via i.t. com o fungo induzindo uma resposta tipo Th1.

A diminuição do CFU encontrado para diferentes concentrações de scFv recombinante encapsulado também está em consonância à literatura. Em nosso trabalho, a concentração 20ng/mL apresentou-se como sendo a mais eficaz no combate ao fungo quando comparada a concentração de 40ng/mL. Este resultado é condizente com os resultados de Amaral *et al.* (2009), onde depois de 30 dias de tratamento, 10µg/ml de P10 encapsulado foi mais eficiente como auxiliar na terapia do que 20µg/ml de P10 livre, demonstrando também que aumentar as quantidades de P10 encapsulado em PLGA-DMSA não tornava o tratamento tão eficiente quanto a concentração de 1µg/ml, mas, em todos os grupos, houve de fato uma capacidade de controlar a recidiva da doença depois de 90 dias. Estes resultados sugerem que há uma redução da quantidade de peptídeo, ou scFv, necessários para o tratamento.

Sabe-se da importância fundamental de células Th1 na mediação da resposta protetora contra *Pb*, enquanto que padrões Th2 estão envolvidos diretamente com a severidade da doença. Mas, para que haja um direcionamento do sistema imune adaptativo à uma resposta do tipo de Th1 ou Th2 o primeiro sinal, é dado a partir da ligação do receptor de células T (TCR) a antígenos apresentados pelas APCs.

Nossos resultados demonstraram um maior recrutamento de células dendríticas e macrófagos para os animais tratados com scFv encapsulado quando comparados aos grupos controles, corroborando assim com os resultados encontrados pelo nosso grupo de pesquisa que demonstrou uma maior participação de macrófagos em animais resistentes (A/Sn), e

secreção de citocinas de perfil Th1 (ALMEIDA *et al.*, 1998; FERREIRA; LOPES; ALMEIDA, 2003).

Outros estudos demonstram que, em animais resistentes, DCs apresentaram uma maior efetividade na apresentação de antígenos do que animais susceptíveis, avaliado por ensaios de proliferação celular em co-cultura de células dendríticas pulsadas com gp43 e linfócitos T (ALMEIDA; LOPES, 2001), e que *Pb* fagocitados foram ainda capazes de reduzir a expressão de MHC-II em células dendríticas imaturas e limitar o aumento da expressão de MHC-II, CD86, CD80 e CD40 que ocorreria após a maturação dessas células, demonstrando uma apresentação de antígeno prejudicada (FERREIRA; LOPES; ALMEIDA, 2004; FERREIRA; ALMEIDA, 2006).

A participação dos macrófagos encontrada em nosso resultado, também apresenta importante papel, uma vez que, na imunidade inata frente a PCM, os fagócitos possuem um importante mecanismo de defesa do hospedeiro, haja vista que o fungo é um microrganismo intracelular facultativo (CALVI *et al.*, 2003, AKTAN, 2004), e de acordo com Popi e colaboradores (2002), esse fungo é fagocitado por macrófagos que apresentam efeitos fungicidas e, portanto, são necessários para a eliminação do fungo. E, além disso, ALMEIDA *et al.*, (1998) observaram que, em camundongos resistentes, antígenos de *Pb* são preferencialmente apresentados por macrófagos, estimulando a produção de citocinas Th1, como IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF-  $\alpha$  associadas a baixa quantidade de TGF-b.

Como mencionado anteriormente, a resistência à infecção causada pelo *Pb* é relacionada também à presença de células produtoras de citocinas Th1. É sabido que camundongos resistentes, da linhagem A/Sn, apresentam resposta imunológica celular preservada, com proliferação de linfócitos e testes de HTT positivos e produção de citocinas do tipo Th1. (CANO *et al.*, 1995; CANO *et al.*, 1998; VAZ *et al.*, 1998; KASHINO *et al.*, 2000). Assim, células Th1 são caracterizadas pela produção de interleucina-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e desempenham papel essencial na ativação de macrófagos e de linfócitos citotóxicos (CTLs).

Para isso, analisamos o perfil de citocinas ativadas nos animais, e encontramos um aumento de IFN- $\gamma$  e IL-12, nos animais tratados com nossa molécula nas concentrações de 20ng/mL e 40ng/ml quando comparados aos grupos controles.

Esses achados a respeito do nível de IFN- $\gamma$  sustentam os resultados anteriores a respeito da ativação celular encontrada, uma vez que para uma eliminação efetiva do *Pb* por monócitos, é necessário um sinal de ativação inicial induzido pelo IFN-  $\gamma$ , com intuito de estimular as células a produzirem TNF-  $\alpha$  que poderá estar envolvido, por intermédio de uma

via autócrina, na fase final do processo de ativação (CALVI *et al.*, 2003). Além disso, o IFN- $\gamma$  incita os macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO), o qual inibe a transformação de *Pb* de conídio em levedura (GONZALEZ *et al.*, 2000). Casadevall e Pirofski (2001), demonstraram que IFN- $\gamma$  aumenta a resposta celular contra fungos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Brummer *et al.*, (1993) e MoscardiBacchi *et al.*, em 1994, sugeriram que macrófagos peritoneais ou pulmonares murinos, ou mesmo monócitos e macrófagos humanos, são capazes de inibir a replicação de *Pb* quando tratados com IFN- $\gamma$ , enquanto macrófagos peritoneais residentes, embora fagocitem as leveduras do fungo, não são capazes de matá-las; esta inibição pode ser abolida pela adição de anticorpos anti-IFN- $\gamma$ .

Os altos níveis de IFN- $\gamma$  em nossos resultados também demonstram a participação fundamental na resistência a doença. Cano e colaboradores, em 1992, demonstraram que a administração de IFN- $\gamma$  recombinante em camundongos infectados potencializa a fagocitose de leveduras de *Pb*, impedindo o progresso da infecção.

Considerada por autores como a principal citocina inflamatória produzida por células fagocíticas, linfócitos B e outras células apresentadoras de antígeno, a IL-12 modula a resposta imune, fornecendo um elo importante entre resistência inata e adaptativa (TRINCHIERI, 1993; HINO *et al.*, 2000)

Nossos resultados para IL-12 também sustentam com os resultados encontrados a respeito dos níveis de IFN- $\gamma$ , e do recrutamento de macrófagos encontrados para os grupos, uma vez que, de acordo com estudos realizados por D' Andrea *et al.*, (1992), uma das atividades fisiológicas mais importantes dessa citocina é induzir a produção de IFN- $\gamma$  por células T e NK. E, inúmeros estudos têm demonstrado que essa citocina é capaz de aumentar a atividade dessas células e de macrófagos, contra vários patógenos intracelulares (TRINCHIERI, 1994; COHEN; COHEN, 1996; GATELY *et al.*, 1998; FIESCHI; CASANOVA, 2003).

ROMANO *et al.*, (2002) demonstraram que a adição de IL-12 em culturas de células mononucleares de pacientes com PCM aumenta a produção de IFN- $\gamma$ , e quando adicionado em culturas junto com anticorpos anti-IL-10, aumenta também a resposta linfoproliferativa frente a antígenos do fungo.

Em camundongos a administração de IL-12 revelou papel protetor, uma vez que, ao promover um intenso infiltrado inflamatório mononuclear nos pulmões, diminuía a disseminação de *Pb* para outros órgãos (ARRUDA *et al.*, 2002). Estes dados, corroboram com os demonstrados previamente por Calich e Kashino em 1998, quando demonstraram que na

PCM murina, a resposta Th1, com produção de IL-12 e diminuição de IL-10 e IL-4 são importantes do controle da PCM experimental. Nossos experimentos também sustentam uma resposta do tipo Th1, com produção de IL-12 e IFN-  $\gamma$ . Já, em relação a IL-4, não observamos diferença significativa.

Fierer e colaboradores, em 1998, utilizando camundongos deficientes para IL-4 e IL-10 demonstraram que essas duas citocinas eram importantes no que diz respeito a suscetibilidade à infecção, mas que, no entanto, a ausência de IL-10 apresentaria maior importância, sugerindo assim que a IL-4 não tem atuação solitária, mas, em consonância com outras citocinas supressoras para a determinação de um padrão de suscetibilidade.

Para PINA e pesquisadores (2004), a ausência de IL-4, não modifica o padrão de citocinas nos pulmões de camundongos deficientes a esta citocina, mas conduz a um aumento da carga de fungos, sendo esta situação, considerada fator protetor na infecção pulmonar pelo *P. brasiliensis* em camundongos.

Para a IL-10, observamos uma diminuição significativa dos níveis desta citocina em camundongos tratados com a nossa molécula recombinante encapsuladas em ambas concentrações (20ng/mL e 40ng/mL) quando comparados aos grupos controle.

Esses baixos níveis de IL-10 também foram vistos por Cano e colaboradores, em 1998, quando avaliaram-se o perfil de citocinas na infecção pulmonar, e constataram que camundongos A/Sn, resistentes à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* apresentavam níveis menores de IL-4, IL-5 e IL-10 quando comparados a camundongos B10, considerados suscetíveis.

E, estes níveis baixos de IL-10 para camundongos tratados com nossa molécula são também sustentados por diversos estudos, tais como o de Kashino e colaboradores (2000), onde postulou-se que a IL-10 foi a citocina mais importante e precocemente produzida quando células de linfonodos de camundongos suscetíveis foram estimuladas com antígeno de *Pb*, no modelo intraperitoneal da PCM murina, enquanto que os camundongos resistentes apresentaram uma secreção tardia dessa citocina, BENARD *et al.*, (2001) onde observaram que pacientes com a doença ativa produziam grandes quantidades de IL-10, fato revertido após a cura efetiva da doença; e que a maior parte dessa citocina era produzida por células aderentes (monócitos), fato comprovado em estudo feito por Manoni (2009). Além disso, Romano *et al.*, (2002) verificaram que a neutralização in vitro da IL-10, era capaz de reverter a supressão da resposta proliferativa de células de pacientes com a doença ativa.



Nossos resultados, demonstraram que, para animais tratados com nossa terapia (scFv recombinante encapsulado), os níveis de IL-17 secretados encontravam-se semelhantes aos níveis encontrados no grupo controle. Essa citocina foi apontada como uma das principais citocinas promotoras da resistência a patógenos por Romani (2011), e Huang e colaboradores, em 2004, e a participação de células Th17, produtoras de IL-17, na resposta imunológica a infecções fúngicas relaciona-se essa citocina à contenção desses patógenos, sobretudo por sua função como citocina pró-inflamatória, atuando na ativação e migração de neutrófilos (FEINEN *et al.*, 2010).

Acredita-se que a resposta Th17 seja, de fato, importante para a contenção da doença, exercendo um papel semelhante àquele observado em outras infecções fúngicas, induzindo uma resposta inflamatória local e ativando células do sistema imunológico inato (CONTI *et al.*, 2009, ROMANI, 2008, GAFFEN, 2008). Porém, esse tipo de resposta poderia apresentar como "efeito colateral" com a produção crônica das citocinas associadas a exacerbação da resposta inflamatória, causando lesão tecidual (ZELANTE *et al.*, 2007; ROMANI; PUC CETTI, 2007).

Segundo Castro e colaboradores (2013), a imunidade Th17 está associada com uma resposta inflamatória crônica da forma adulta da doença, com importante participação de células Th1. Entretanto, a resistência à infecção observada em indivíduos assintomáticos mostrou ser mediada por uma resposta Th1 predominante, sendo esta responsável pela ativação de macrófagos. Enquanto a forma mais grave da doença, a forma juvenil, apresenta uma resposta Th2 predominante, que está associada com uma resposta de anticorpo melhorada.

Após nossos animais tratados com scFv recombinante encapsulado apresentarem um padrão de citocinas que direcionam uma resposta do tipo Th1, com aumento dos níveis de IL12 e IFN- $\gamma$ , e diminuição de IL-10, e a manutenção de IL-4 e IL-17, era importante entender se no nosso modelo de tratamento seria capaz de ativar a resposta imune humoral.

A literatura demonstra que, nos camundongos resistentes (linhagem A/Sn – A/J) a resposta imunológica celular é preservada, com linfoproliferação e testes de HTT positivos e produção de citocinas do tipo Th1 como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), assim como produção de anticorpos da classe IgG2a (CANO *et al.*, 1995, VAZ *et al.*, 1998). Ainda, De acordo com a literatura (STAVNEZER *et al.*, 1996), IgG1 modula a resposta para o tipo Th2, enquanto que IgG2a e IgG2b está relacionada a uma resposta do tipo Th1.

Visto a importância desses isotipos na PCM experimental, analisamos a sua produção após os diferentes tratamentos. No entanto, os resultados não demonstram diferença na produção de imunoglobulinas. Talvez, o tempo analisado, bem como as concentrações escolhidas para os ensaios não tenham sido eficientes para observarmos alguma diferença na produção dos isotipos IgG1 e IgG2a.

Sabemos que a resposta imune gerada frente a um patógeno é muito complexa e que apesar de não observarmos diferença na produção de imunoglobulinas, nossos resultados sugerem que o scFv recombinante encapsulado seja uma terapia eficiente no modelo de tratamento realizado, pois modulam a resposta imune de maneira favorável no controle da infecção por *Pb*, com ativação de resposta protetora do tipo  $Th1$ , bem como da diminuição da carga fúngica pulmonar, sugerindo que o encapsulamento da molécula de scfv que mimetiza a gp43 de *Pb*, seja eficiente no controle da PCM experimental.

## 6 - CONCLUSÃO:

- ✓ A imunização com scFv induz o recrutamento de células apresentadoras de antígeno: DCs e Macrófagos quando os animais foram tratados com scFv encapsulado.
  
- ✓ Após 7, 14 e 21 dias de infecção foi realizado os tratamentos, e observou-se um padrão de respostas do tipo Th1: IFN-  $\gamma$  e IL-12 encontraram-se aumentadas, nos pulmões, com diminuição dos níveis de IL-10 e manutenção dos níveis de IL-4 e IL-17
  
- ✓ Perfil da resposta humoral: Após o tratamento com scFv encapsulado, não ocorreu diferença dos níveis de IgG1 e IgG2a.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, A., GOMEZ, I., VELEZ, P., RESTREPO, A. Adrenal function in paracoccidioidomycosis: a prospective study in patients before and after ketoconazole therapy. **Infection**. 14(1):22–26. 1986.

ABE, H.; KUROKI, M.; TACHIBANA, K.; LI, T.; AWASTHI, A.; UENO, A.; MATSUMOTO, H.; IMAKURE, T.; YAMOUCI, Y.; YAMADA, H.; ARIYOSHI, A.; KUROKI, M.. Target sonodynamic therapy of cancer using a photosensitizer conjugated with antibody against carcinoembryonic antigen. **Anticancer Res.**,22: 1575-80, 2002.

AGUIAR, W.S.; SILVA, B.M.; PASSOS, E.D.; ZANDONADE, E.; FALQUETO, A. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a casecontrol study in the State of Espírito Santo, Brazil. **Cad. Saude Publica**, v.19, p.245–253, 2003. (In Portugese.)

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sci** 75:639-53. 2004.

ALBORNOZ, M. B. Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**. v.9. p.248–253.1971.

ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e na Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v.5, p.125-141, 1930.

ALMEIDA, O.P; JACKS, J. Jr; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: na emerging deep mycosis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.14, p.377-383, 2003.

ALMEIDA, S. M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TEIVE, H.A.; RIBEIRO, C.E.; WERNECK, L.C. Central nervous system paracoccidioidomycosis: clinical features and laboratorial findings. **J. Infect**. v.48, p.193–198, 2004.

AMARAL AC, BOCCA AL, RIBEIRO AM, NUNES J, PEIXOTO DLG, SIMIONI AR *et al.*. Amphotericin B in poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. **J Antimicrob Chemother** 63: 526–533. 2009.

AMERI, M., ZHOU, E.M, JIANG, Z. The mouse as an experimental model to modulate antibody response to porcine reproductive and respiratory virus glycoprotein 5 using antiidiotypic antibodies. **Vet Pathol** 42:707. 2005

AMRI, M., AISSA, S.A, BELGUENDOZ, H., MEZIOUG, D., TOUIL-BOUKOFFA, C. In vitro antihydatic action of IFN- $\gamma$  is dependent on the nitric oxide pathway. **J Interferon Cytokine Res**. 27:781–788. 2007.

ARISTIZABAL, B.H, CLEMONS, K.V, STEVENS, D.A, RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females.

**Infect Immun.** 66(11):5587-91. 1998

ARRUDA, C., M. F. FRANCO, S. S. KASHINO, F. R. NASCIMENTO, A. FAZIOLI, R.D.O.S, C. A.VAZ, M. RUSSO, V. L. CALICH. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clin Immunol** 103:185-95. 2002.

ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; PINA, A.; KASHINO, S. S.; FAZIOLI, BACCHI MM, BRUMMER E, STEVENS DA. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J Med Microbiol** 40: 159–164. 1994

BAGAGLI, E. *et al.*. High frequency of study. **Medical Mycology.** v.41. n.3. p.217-223. 2003.

BAGAGLI, E. *et al.*. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.58. p.505-12. 1998.

BAGAGLI, E. *et al.*. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia.** v. 165. p. 197–207. 2008.

BAGAGLI, E., BOSCO, S. M. G., RICHINI-PEREIRA, V.B., THEODORO, R. C., MARQUES, S. A. *Paracoccidioides* (chapter 40) In: Molecular detection of human fungal pathogens ed.Sydney. **Australia. CRC Press.** v.1. p.311-322. 2011.

BAGAGLI, E., BOSCO, S. M., THEODORO, R. C. AND FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol** 6(5): 344-51. 2006

BAGAGLI, E., SANO, A., COELHO, K.I, ALQUATI, S., MIYAJI, M., DE CAMARGO, Z.P, GOMES, G.M, FRANCO, M., MONTENEGRO, M.R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg.** 58(4):505-12. 1998.

BAIDA, G.; BUDARINA, Z.I.; KUZMIN, N.P.; SOLONIN, A.S. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiol Lett.** v.180 (1), p.7-14, 1999.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y.J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol,** v.18, p.767-811, 2000.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature Review,** v.392, p.245-52, 1998.

BARROZO, L.V.; BENARD, G.; SILVA, M.E.S.; BAGAGLI, E.; MARQUES, S.A.; MENDES R.P. First Description of a Cluster of Acute/Subacute Paracoccidioidomycosis Cases and Its Association with a Climatic Anomaly. **PloS One**, V.4, e643, 2010.

BENARD, G., HONG, M.A, DEL NEGRO, G.M, BATISTA, L., SHIKANAI-YASUDA, M.A, DUARTE, A.J. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg.** 54(1):7-12. 1996

BENARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE, C. R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S. Imbalance of IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, 13 (4): 248-52, 2001.

BETÁKOVA, T.; VARECKOVÁ, E.; KOSTOLANSKÝ, F.; MUCHA, V.; DANIELS, R.S. Monoclonal anti-idiotypic antibodies mimicking the immunodominant epitope of influenza virus haemagglutinin elicit biologically significant immune responses. **J. Gen. Virol.**, 79: 461470, 1998.

BHATTACHARYA-CHATTERJEE, M., CHATTERJEE, S.K, FOON, K.A. Anti-idiotypic vaccine against cancer. **Immunol Lett** 74:51–58. 2000.

BLOTTA, M. H., *et al.*. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.61, p.390– 394, 1999.

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

BONA, C.; MORAN, T. Idiotypic vaccines. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.** 136:299-312, 1985.

BONA, C.A. Internal image concept revisited. **Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.**, 213: 32-42, 1996.

BONIFAZ, A. Micología médica básica. **McGraw Hill Interamericana Editores**, 2010.

BORELLI D. Hipótesis sobre ecología de Paracoccidioides. **Dermatol Venez.** 1961. 3: 130-32.

BOSSIE, A., VITETTA, E.S. IFN- $\gamma$  enhances secretion of IgG2a from IgG2a-committed LPSstimulated murine B cells: implications for the role of IFN- $\gamma$  in class switching. **Cell Immunol.** 1991;135:95–104

BRETSCHER, P. The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. **Immunol. Today**, v. 13, p. 74–76, 1982.

BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO A. Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. **Biotecnologia Ciencia em Desenvolvimento**, São Paulo, v. 26, p. 44-51, 2002

BRIGIDO, M.M, WALTER, M.E, OLIVEIRA, A.G, INOUE, M.K, ANJOS, D.S, SANDES, E.F, GONDIM, J.J, CARVALHO, M.J, ALMEIDA, N.F JR, FELIPE, M.S. Bioinformatics of the *Paracoccidioides brasiliensis* EST Project. **Genet Mol Res.** 4(2):203-15. 2005

BRIGIDO, M.M.; POLYMENIS, M.; STOLLAR, B.D. Role of mouse VH10 and VL gene segments in the specific binding of antibody to Z-DNA, analyzed with recombinant single chain Fv molecules. **J. Immunol.** v.150 (2), p.469-79, 1993.

BRUMMER, E., CASTANEDA, E., RESTREPO, A.. *Paracoccidioidomycosis*: an update. **Clin Microbiol Rev** 6: 89–117. 1993

BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN- $\gamma$  for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of Immunology**, v.140, n.8, p.2786-2789, 1988

CADAVID, D.; RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiol. Infect.**, v.111, p.121–133, 1993.

CALICH, V. L. G.; BLOTTA, M. H. S. L. Pulmonary *Paracoccidioidomycosis*. In: FIDEL, P. L.; HUFFNAGLE, G. B. (Ed.) **Fungal Immunology, From an Organ Perspective**. New York, NY: Springer, 2005. p. 201-228.

CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 615623. 1998.

CAMARGO, Z.P, FRANCO, M.F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of *paracoccidioidomycosis*. **Rev Iberoam Micol.** 17(2):41-8. 2000

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

CANO, M.I, CISALPINO, P.S, GALINDO, I., RAMÍREZ, J.L, MORTARA, R.A, DA SILVEIRA, J.F. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol.** 36(3):742-7. 1998.

CARRERO, L.L, NIÑO-VEGA, G., TEIXEIRA, M.M, CARVALHO, M.J, SOARES, C.M, PEREIRA M, JESUÍNO, R.S, MCEWEN, J.G, MENDOZA, L., TAYLOR, J.W, FELIPE, M.S.F, SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal. Genet. Biol.** 45, 605–612. 2008

CASADEVALL, A, PIROFSKI, L. Adjunctive immune therapy for fungal infections. **Clin Infect Dis.** 33(7):1048-56. 2001

CASTRO, L. F. *et al.*. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **Journal of infect.**, v. 5, n. 67, p. 470-85, 2013.

CHAVEZ-RUEDA, K, AGUNDIS-MATA, C, ZENTENO, E. *et al.*. Development of a diagnostic test for *Entamoeba histolytica* using idiotype expression in human. **J Immunol Methods** 262:29–40. 2002

CHESTER, K. A.; HAWKIN, R. E. Clinical issues in antibody design. **Trends Biotechnol.**, v. 13, n. 8, p. 294-300, 1995.

CHIARELLA, A.P.; ARRUDA, C.; PINA, A.; COSTA, T.A.; CALICH, V.L.G. The relative importance of CD4+ and CD8+ T cells in immunity to pulmonar paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v.9, p.1078-1088, 2007.

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

COMMANDEUR, S.; VAN BEUSEKOM, H.M. AND VAN DER GIESSEN. Polymers drug release and drug-eluting stents. **J. Interv. Cardiol.** 19:500-506, 2006.

CONTI, H.R., F. SHEN, N. NAYYAR, E. STOCUM, J.N. SUN, M.J. LINDEMANN, *et al.*. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. **J Exp Med**, 206 (2):299-311. 2009.

COUTINHO A. Will the idiotypic network help to solve natural tolerance? **Trends Immunol.** 24:53-4. 2003.

COUTINHO, Z. F. *et al.*. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995).**Cad Saude Publica**, v. 18: 1441-1445. 2002.

COUTINHO, Z.F., DA SILVA, D., LAZÉRA, M., PETRI, V., DE OLIVEIRA, R.M., SABROZA, P.C., WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública.** 18:1441-1454. 2002

D' ANDREA, A.; RENGARAJU, M.; VALIANTE, N. M.; CHEHIMI, J.; KUBIM, M.; ASTE, M. *et al.*. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. **J Exp Med**, 176: 1387-98, 1992.

DE CAMARGO, CARMELINDA UNTERKIRCHER, SIBELE P. CAMPOY, AND LUIZ R. TRAVASSOS. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* Exoantigens for Immunodiffusion Tests. **Journal of clinical microbiology**, Oct. p. 2147-2151. 1988.

DE CAMARGO, Z.P, BERZAGHI, R., AMARAL, C.C, SILVA, S.H.M. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. **Med Mycol** 41: 539–542. 2003.



DE CAMARGO, Z.P, GUESDON, J.L, DROUHET, E., IMPROVISI, L.. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmunoelectrophoresis and erythro-immunoassay. **Mycopathologia** 88: 31–37. 1998.

DE CAMARGO, Z.P. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**. AprMay;165(4-5):289-302. 2008

DINCA, L., NEUWIRTH, S., SCHULMAN, J. *et al.*. Induction of antihemagglutinin antibodies by polyclonal antiidiotypic antibodies. **Viral Immunol** 6:75–84.1993

DOBROVOLSKAIA, M.A, MCNEIL, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nat Nanotechnol.** Aug;2(8):469-78. 2007

DUBSKY, P.; UENO, H.; PIQUERAS, B.; CONNOLLY, J.; BANCHEREAU, J.; PALUCKA, A.K.. Human dendritic cell subsets for vaccination. **J. Clin. Immunol.**, v. 25(6), p.551-72, 2005.

ELBASHIR, M.I, BRODIN, T., AKERSTROM, B., DONNER, J. Monoclonal antibodies to the pituitary growth-hormone receptor by the anti-idiotypic approach. Production and initial characterization. **Biochem J.** 266:467–474. 1990.

ERIC PETERSON , 1 S. MICHAEL OWENS , 1 AND RALPH L. HENRY 2 Monoclonal Antibody Form and Function: Manufacturing the Right Antibodies for Treating Drug Abuse. **The AAPS Journal** 8 (2) Article 43. 2006

FAVA, S.D.C.; FAVA-NETTO, C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.40, p.1–14, 1998.

FÈ D'OSTIANI, C.; DEL SERO, G.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; SPRECA, A.; MENCACCI, A.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; ROMANI, L. Dendritic cells discriminate between yeast and hyphae of the fungus *Candida albicans*: implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. **J. Exp. Med.** 15:1661, 2000.

CALVI, S.A.; PERAÇOLI, M.T.S.; MENDES, R.P.; MARCONDES-MACHADO, J.; FECCHIO, D.; MARQUES, S.A.; SOARES, A.M.V.C. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes and Infection**, v.5, p.107-113, 2003.

FELONATO, M.; PINA, A.; ARAUJO, E.F.; LOURES, F.V.; BAZAN, S.B.; FERIOTTI, C.; CALICH, V.L.G. Anti-CD25 treatment depletes treg cells and decreases disease severity in susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Plos One**, v.7, n.11, p.E51071-1-E51071-20, 2012.

FERREIRA, K.S. AND ALMEIDA, S.R. Immunization of susceptible mice gp43-pulsed dendritic cells induced an increased of pulmonary paracoccidioidomycosis. **Immunology Letters**, v2, p. 121-126, 2005.

FERREIRA, K.S.; MARANHÃO, A.Q.; GARCIA, M.C.; BRÍGIDO, M.M.; LOPES, J.D.; ALMEIDA, S.R. Dendritic cells transfected with scFv from Mab 7.B12 mimicking original antigen gp43 induces protection against experimental Paracoccidioidomycosis. **PloS One**, v.6, e15935, 2011.

FERREIRA, M. S.; FREITAS, L. H.; LACAZ, C. S., *et al.*. Isolation and characterization of Paracoccidioides brasiliensis strain from a dog food probably contaminated with soil in Uberlândia, Brasil. **J. Med. Vet. Mycol.** 28: 253–256. 1990.

FERREIRA, M.C.; OLIVEIRA, R.T.D.; SILVA, R.M.; BLOTTA, M.H.S.L.; MAMONI, R.L. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. **Infection of Immunity**, v.78, n.10, p.4392-4401, 2010.

FIESCHI, C.; CASANOVA, J. L. The role of interleukin-12 in human infectious diseases: only a faint signature. **Eur J Immunol**, 33(6): 1461-4, 2003.

FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med.**, v.170, p.2081-2095, 1989.

FORTES, M.R.P. *et al.*. Imunologia da Paracoccidioidomicose. **Ann Bras Dermatol**, v. 86, n. 3, p. 516-25, 2011

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

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, 25: 5-18, 1986.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C.S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med. Mycol.** V.38, p.185–191, 2000.

FRANCO, M.; MENDES, R. P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; R. MONTENEGRO, M. Paracoccidioidomycosis. **Baillieres Clin. Trop. Med. Commun**, v.4, p.185–220, 1989.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 20: 129-132, 1987.

FRANCOTTE, M., URBAIN, J. Induction of anti-tobacco mosaic virus antibodies in mice by rabbit antiidiotypic antibodies. **J Exp Med** 160:1485–1494. 1984

GAFFEN, S.L., N. HERNANDEZ-SANTOS, A.C. PETERSON. IL-17 signaling in host defense against *Candida albicans*. **Immunol Res**, 50 (2-3):181-7. 2011,

GAJEWSKI, T.F, FITCH, F.W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J Immunol.** 140:4245-52, 1988.

GANESH, B.B.; CHEATEM, D.M.; SHENG, J.R.; VASU, C.; PRABHAKAR, B.S. GM-CSF-induced CD11c+CD8a--dendritic cells facilitate Foxp3+ and IL-10+ regulatory T cell expansion resulting in suppression of autoimmune thyroiditis. **International Immunology**, v.21, p.269-282, 2009.

GARDNER, M.J, MORRISON, C.A, STEVENSON, L.Q, FLINT, D.J. Production of anti-idiotypic antisera to rat GH antibodies capable of binding to GH receptors and increasing body weight gain in hypophysectomized rats. **J Endocrinol**. 125:53–59. 1990.

GATELY, M. K., L. M. RENZETTI, J. MAGRAM, A. S. STERN, L. ADORINI, U. GUBLER, and D. H. PRESKY. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. **Annu Rev Immunol** 16:495-521. 1998.

GESZTESI, J.L, PUCCIA, R., TRAVASSOS, L.R, VICENTINI, A.P, DE MORAES, J.Z. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. **Hybridoma** 15: 415–422. 1996

GEZUELE, E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. de heces de pingüino de la Antártida. In: San-Blas G, ed. Proceedings IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis. Caracas, Venezuela: **Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)**. Abstract B2. 1989.

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

GOLDANI LZ, MONTEIRO CM, DONALDI EA, MARTINEZ R, VOLTARELLI JC. HLA antigens in Brazilian patients with paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**. 114(2): 89-91. 1991

GOLDANI, L.Z.; PICARD, M.; SUGAR, A.M. Synthesis of heat – shock proteins in mycelia and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Microbiol.**, v.40, p.124-128, 1994.

GOLDMAN, M.H.S, TAYLOR, J.W, MCEWEN, J.G, NOBREGA, M.P, NOBREGA, F.G, GOLDMAN, G.H. Detection and selection of microsatellites in the genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as molecular markers for clinical and epidemiological studies. **Journal of Clinical Microbiology** 42: 5007-5014. 2004

GONZALEZ, A.; DE GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages. **Infection and Immunity**, v.68, n.5, p.2546-2552, 2000

GROSE, E.; TAMSITT, J.R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, v. 4(2), p. 124-125, 1965.

GROSS, O.; GEWIES, A.; FINGER, K.; SCHÄFER, M.; SPARWASSER, T.; PESCHEL, C.; FÖRSTER, I.; RULAND, J. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate antifungal immunity. **Nature**, v. 442 p. 651-656, 2006.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu. Rev. immunol.**, v. 20, p. 612-67, 2002.

HAHN, R.C, MACEDO, A.M, FONTES, C.J.F, BATISTA, R.D, SANTO, N.L, HAMDAN, J.S. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol.** 41(7):2849-54. 2003

HAHN RC, MACEDO AM, SANTOS NL, RESENDE JCP, HAMDAN JS. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* atypical isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **Rev. Iberoam. Micol.** 19:49–51. 2002

HAI-NAN LANA , HAI-LONG JIANGA , WEI LIL,a, TIAN-CHENG WU, PAN HONG, YU

MENG LI, HUI ZHANG, HUAN-ZHONG CUI, and XIN ZHENG. Development and Characterization of a Novel Anti-idiotypic Monoclonal Antibody to Growth Hormone, Which Can Mimic Physiological Functions of Growth Hormone in Primary Porcine Hepatocytes. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* Vol. 28, No. 4 : 573-583 April 2015.

HAN, Y., AND J. E. CUTLER. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. **Infect. Immun.** 63:2714-2719. 1995.

HAN, Y., M. A. ULRICH, AND J. E. CUTLER. *Candida albicans* mannan extract-protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. **J. Infect. Dis.** 179:1477-1484. 1999.

HAN, Y., M. H. RIESSELMAN, AND J. E. CUTLER. Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannan as an IgM protective antibody. **Infect. Immun.** 68:1649-1654. 2000.

HAN, Y., R. P. MORRISON, AND J. E. CUTLER. A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. **Infect. Immun.** 66:5771-5776. 1998.

HAN, Y., T. KANBE, R. CHERNIAK, AND J. E. CUTLER. Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. **Infect. Immun.** 65:4100-4107. 1997.

HE, F.T; LI, R.F; ZHANG, Y.; JI, Q.; CHEN, B.J., QIAO, T.D.; FAN, D.M. Preparation of phage-displayed single chain variable fragments of monoclonal antibody MC5 recognizing colorectal carcinoma. **Ai Zhang**, v.21(6), p.636-369, 2002.

HE, J., FAN, M.T, LIANG, Y., LIU, X.J. Application of anti-idiotypic antibody in small molecules immunoassay. **Chinese J Anal Chem** 38:1366–1370. 2010

HINO, A.; IGARASHI, O.; IAGAWA, Y.; IWAKURA, Y.; NARIUCHI, H. Interferon- $\gamma$  priming is not critical for IL-12 production of murine spleen cells. **Cytokine**, 12: 12-20, 2000.

HOLLIGER P, HUDSON P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nat Biotechnol.** Sep;23(9):1126-36. 2005

HUDSON, P.J, Recombinant antibody constructs in cancer therapy. **Curr Opin Immunol.** Oct;11(5):548-57. 1999

HUSTON, J.S.; MUDGEH-HUNTER, M.; TAI, M.S.; McCARTNEY, J.; WARREN, F.; HARBER, E.; OPPERMAN, H. Protein engineering of single chain Fv analogs and fusion proteins. **Methods in Enzymology**, v.203, p.46-88, 1991.

J. Q. GUO, S. Y. YOU, L. LI, Y. Z. ZHANG, J. N. HUANG, AND C. Y. ZHANG, "Construction and high-level expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for acidic isoferritin in *Escherichia coli*," **Journal of Biotechnology**, vol. 102, no. 2, pp. 177–189, 2003.

JANNUZZI, G.P, Caracterização fenotípica de células dendríticas transfectadas com scFv obtido a partir de anticorpo monoclonal anti-idiotípico Ab2-p, que mimetiza o antígeno gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* -- 75p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.São Paulo, 2013.

JERNE, N.K. Towards a network theory of the immune response. **Ann. Immunol. Paris**, v.125, p.373-89, 1974.

K. DAI, H. ZHU, AND C. RUAN, "Generation and characterization of recombinant single chain Fv antibody that recognizes platelet glycoprotein Ib $\alpha$ ," **Thrombosis Research**, vol. 109, no. 2-3, pp. 137–144, 2003.

K. SAKAI, Y. SHIMIZU, T. CHIBA *et al.*, "Isolation and characterization of phage-displayed single chain antibodies recognizing nonreducing terminal mannose residues. 1. A new strategy for generation of anti-carbohydrate antibodies," **Biochemistry**, vol. 46, no. 1, pp. 253–262, 2007.

KARHAWI, A.S.; COLOMBO, A.L.; SALOMAO, R. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Medical Mycology**, v.38, n.3, p.225-229, 2000.

KASHINO, S. S., A. FAZIOLI RDOS, M. MOSCARDI-BACCHI, M. FRANCO, L. M. SINGER-VERMES, E. BURGER, AND V. L. CALICH. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia** 130:131-140. 1995.

KAUFMANN, S.H. T cell clones and their products: experimental clues for the immunoprophylaxis and immunotherapy of intracellular bacterial infections? **Infection** 2:177–183. 1985

KAZUMA, S.M. Expressão de fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL eletronegativa (scFv) em *Pichia pastoris* e seu efeito sobre a formação de células espumosas. 124p. Dissertação (Mestrado). FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. São Paulo, 2010.

KENNEDY, R.C, DREESMAN, G. R. Enhancement of the immune response to hepatitis B surface antigen. In vivo administration of antiidiotype induces anti-HBs that expresses a similar idiotype. **J Exp Med** 159:655–665. 1984

KENNEDY, R.C, DREESMAN, G.R. Anti-idiotypic antibodies as idiotope vaccines that induce immunity against infectious agents. **Int Rev Immunol** 1:6778. 1976

KIM, M.K, JEONG, H.J, KAO, C.H.K, *et al.*. Improved renal clearance and tumor targeting of 99mTc-labeled anti-Tac monoclonal antibody Fab by chemical modifications. **Nucl Med Biol.** 29(2):139–46. 2002

LACAZ, C. S (2a ). **Tratado de Micologia Médica** Lacaz, 2nd edn. São Paulo: Sarvier, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI MELO, N. T. Paracoccidioidomicose, *In* LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI MELO, N.T. (ed.), *Tratado de micologia medica* Lacaz, **Sarvier**, 2002. p. 639–729, v.9.

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

LACAZ, C.S.; PASSOS FILHO, M.C.R.; FAVA NETTO, C.; MACARRON, R. Contribuição, para o estudo da blastomicose-infecção: inquérito com paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico radiológico dos paracoccidioidino-positivos. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 1: 245-259, 1959.

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

LAN, H., ZHENG, X., KHAN, M.A, LI, S. Anti-idiotypic antibody: A new strategy for the development of a growth hormone receptor antagonist. **Int J Biochem Cell Biol.** Sep 11;68:101-108. 2015. doi: 10.1016/j.biocel.2015.09.004

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. **Cell.** V.106, n.3, p. 263-6, 2001.

LE GROS, G.; BEN-SASSON, S.Z.; SEDER, R.; FINKELMAN, F.D.; PAUL, W.E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells *in vivo* and *in vitro*: IL-2 and IL-4 are required for *in vitro* generation of IL-4- producing cells. **J Exp Med.**, v.172, p.921-929, 1990.

LE GROS, G.; BEN-SASSON, S.Z.; SEDER, R.; FINKELMAN, F.D.; PAUL, W.E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells *in vivo* and *in vitro*: IL-2 and IL-4 are required for *in vitro* generation of IL-4- producing cells. **J Exp Med.**, v.172, p.921-929, 1990

LENZI, H.L.; CALICH, V.L.G.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; XIDIEH, C.F.; MIYAJI, M.; MOTA, E. M.; MACHADO, M.P.; RESTREPO, A. Two Patterns Of Extracellular Matrix Expression In Experimental Paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 115-119, 2000.

LOBATTO, M.E. *et al.*. Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v.10, p.835-852, 2011.

LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D. Paracoccidioidomicose: estudo clinico-micologico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. **J. Pneumol.**,v.16, p.129-132, 1990.

LOPES, J.D.; MAIVA-CAMPOS, M.C.; VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; de-SOUZA, W.; CAMARGO, Z.P. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin – binding of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Braz J. Med. Biol. Res.**, v.27, p.2309-2313, 1994.

LORIMER, I. A. Imunotoxinas recombinantes específicas para um receptor do factor de crescimento epidérmico: mutante alvo com um único domínio variável de cadeia de anticorpo isolado por exibição por fagos. Proc. **Natl. Acad. Sci. EUA**, v. 93, n. 25, p. 14815-14820, 1996

LOURES, F. V. *et al.*. TLR2 is a negative regulator of Th17cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol.**, v. 78, p.1078-1088, 2009.

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

M. KUROKI, F. ARAKAWA, P. D. KHARE *et al.*, “Specific targeting strategies of cancer gene therapy using a single-chain variable fragment (scFv) with a high affinity for CEA,” **Anticancer Research**, vol. 20, no. 6 A, pp. 4067–4071, 2000.

M. SHADIDI AND M. SIOUD, “An anti-leukemic single chain fv antibody selected from a synthetic human phage antibody library,” **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 280, no. 2, pp. 548–552, 2001.

M.B. PUCCA, T.B. BERTOLINI, J.E. BARBOSA, S.V.R.GALINA, G.S. Port. Therapeutic monoclonal antibodies: scFv patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 47, n. 1, jan./mar., 2011

MALDONADO-LÓPEZ R, MOSER M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. **Semin Immunol.** Oct;13(5):275-82. 2001

MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, v. 32, n. 1, p. 2029, 2005.

MANGIATERRA, M.L, GIUSIANO, G.E, ALONSO, J.M, GORODNER, J.O. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in a subtropical region with important environmental changes. **Bull Soc Pathol Exot.** 92(3):173-6. 1999.

MARAGOS, C. Photoreaction of indole-containing mycotoxins to fluorescent products. **Mycotoxin Res.** 25, 67–75. 2009

MARAGOS, C.M, BUSMAN, M. Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: a review. **Food Addit Contam. A** 27:1–13. 2010

MARAGOS, C.M, LI, L., CHEN, D. Production and characterization of a single chain variable fragment (scFv) against the mycotoxin deoxynivalenol. **Food Agric Immunol** 23:51-67. 2012

MARAGOS, C.M, MCCORMIC, S.P. Monoclonal antibodies for the mycotoxins deoxynivalenol and 3-acetyl-deoxynivalenol. **Food Agric Immunol** 12:181–192. 2000

MARAGOS, C.M, PLATTNER, R.D. Rapid fluorescence polarization immunoassay for the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. **J Agric Food Chem** 50:1827–1832. 2002

MARAGOS, C.M. Signal amplification using colloidal gold in a biolayer interferometry-based immunosensor for the mycotoxin deoxynivalenol. **Food Addit Contam. A** 29:1108–1117. 2012

MARANHÃO, A.Q.; BRÍGIDO, M.M. Expression of antiZ-DNA single chain antibody variable fragment on the filamentous phage surface. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, p.569-579, 2000.

MARQUES, A. F.; SILVA, M. B.; JULIANO, M. A. P.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 8, p. 2814-2819, 2006.

MATUTE, D.R, MCEWEN, J.G, MONTES, B.A, SAN-BLAS, G, BAGAGLI, E, RAUSCHER, J.T, RESTREPO, A., MORAIS, F., NINO-VEGA, G., TAYLOR, J.W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol.** 23: 65-73. 2006.

MATUTE, D.R, MCEWEN, J.G, PUCCIA, R., MONTES, B.A, SAN-BLAS, G., Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol** 23: 65–73. 2006.



- McEWEN, J. G., BEDOYA, V., PATINO, M. M., SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.** 25(3):165-75, 1987.
- MCEWEN, J. G., V. BEDOYA, M. M. PATINO, M. E. SALAZAR, AND A. RESTREPO. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.** 25:165-175. 1987.
- McEWEN, J.G.; GARCIA, A.M.; ORTIZ, B.L.; BOTERO, S.; RASTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.**, v. 26, p.305-306, 1995.
- MCNAMARA, M.K, WARD, R.E, KÖHLER, H. Monoclonal idiotope vaccine against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Science** 226:1325–1326. 1984.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, Jr. C. Fly immunity: great expectations. **Genome Biol.** 2000;1(1):REVIEWS106. Epub 2000 Jun 9. Review.
- MENDES-GIANNINI, M.J, MONTEIRO DA SILVA, J.L, DE FÁTIMA DA SILVA, J, DONOFRIO, F.C, MIRANDA, E.T, ANDREOTTI, P.F. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia.**;165:237-248. 2008
- MOHANRAJ, V.J. AND CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research.** 5: 561-573, 2006.
- MOLINARI-MADLUM EE, FELIPE MS, SOARES CM. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Med Mycol.** 37(4):269-76. 1999
- MOLL, H.; BERBERICH, C. Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniosis. **Immunobiology**, v.204, n.5, p.659-666, 2001.
- MONTENEGRO, M. R. G.; FRANCO, M. PATHOLOGY. IN: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, M. A.; DEL NEGRO, G. eds. *Paracoccidioidomycosis*. 1st edn. Boca Raton: **CRC Press**, 131–150. 1994
- MONTOYA, A.E, ALVAREZ, A.L, MORENO, M.N, RESTREPO, A., MCEWEN, J.G. Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.** 37: 219-22. 1999.
- MONTOYA, A.E, MORENO, M.N, RESTREPO, A., MCEWEN, J.G. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol.** 21(2):223-227. 1997
- MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O’GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunology**, v.19, p.683-765, 2001.
- MOSCARDI-BACCHI, M., FRANCO, M. Experimental *Paracoccidioidomycosis* in the mouse. III Histopathological and immunological findings after intravenous infection in the presence or absence of previous immunization. **Rcv, Soe, Br. Med. Trop.**, IS: 101-108, 1985.

- MUELLER, D.L.; JENKINS, M.K.; & SCHWARTZ, R.H. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 445–480, 1989.
- N. KOBAYASHI, M. OHTOYO, E. WADA, Y. KATO, N. MANO, AND J. GOTO, “Generation of a single-chain Fv fragment for the monitoring of deoxycholic acid residues anchored on endogenous proteins,” **Steroids**, vol. 70, no. 4, pp. 285–294, 2005.
- NAGIB, P.R.A.; GAMEIRO, J.; COSTA, T.A.; GANGI, R. Effect of HeNe laser Irradiation on Extracellular Matrix Deposition and Expression of Cytokines and Chemokines in Paracoccidioidomycotic Lesions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 4, p. 920-924, 2010.
- NAKAMURA, L. T., B. A. WU-HSIEH, AND D. H. HOWARD. Recombinant murine gamma interferon stimulates macrophages of the RAW cell line to inhibit intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.** 62:680-684. 1994.
- NASCIMENTO, T., MARTINEZ, R., LOPES, A.R, BERNARDES, L.A.D, BARCO, C.P, NEGRONI, P. Aislamiento del Paracoccidioides brasiliensis de una muestra de tierra del Chaco Argentino. **Bol Acad Nac Med Buenos Aires**; 45: 513–516. 8. 1967.
- NEGRONI, R. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lutz's mycosis). **Int. J. Dermatol.** 32:847-859. 1993.
- NINO-VEGA GA, CALCAGNO AM, SAN-BLAS G, SAN-BLAS F., GOODAY GW, GOW NA. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of Paracoccidioides brasiliensis. **Med. Mycol.** 38:437–441. 2000
- NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Paracoccidioidomycosis. **Curr. Fungal Infect. Rep.** v.3, p.15–20, 2009.
- OLIVEIRA, L.L, COLTRI, K.C, CARDOSO, C.R.B, ROQUE-BARREIRA, M.C., PANUNTO-CASTELO, A. **Plos Negl Trop** Dise. 2(3):e183. 2008
- OOSTERLAKEN, T.A, BRANDENBURG, A, SCHIELEN, P. *et al.*. Efficient induction of Semliki Forest virus and mumps virus neutralizing anti-anti-idiotypic antibodies using Quil A as adjuvant. **J Immunol Methods** 136:169–175. 1991
- ORIUCHI, N., HIGUCHI, T., HANAOKA, H., IIDA, Y., ENDO, K. Current status of cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibody. **Ann Nucl Med.** 19(5):355–65. 2005
- ORTEN, D.J, REDDY, P.G, REDDY, D.N *et al.*. Induction of immune response to bovine herpesvirus-1 with anti-idiotypic antibodies. **Viral Immunol** 4:111–122. 1991
- P. RAVN, A. DANIELCZYK, K. BAK JENSEN *et al.*, “Multivalent scFv display of phagemid repertoires for the selection of carbohydrate-specific antibodies and its application to the Thomsen-Friedenreich antigen,” **Journal of Molecular Biology**, vol. 343, no. 4, pp. 985–996, 2004.

PAGLIARI, C., E.R. FERNANDES, F.W. STEGUN, W.L. DA SILVA, M.I. SEIXAS DUARTE, M.N. SOTTO. Paracoccidioidomycosis: Cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. **Microb Pathog**, 2011,

PAGLIARI, C., PEREIRA, N.V, KANASHIRO, L., STEGUN, F.W, CRODA, J, DUARTE, M.I, *et al.*. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. **J Cutan Pathol.** ;37:565-70. 2010

PAIÃO, M.R. Avaliação da participação de células produtoras de il-17 (th17) na paracoccidioidomicose humana: efeito do tratamento com il-17 e il-23 sobre a atividade fungicida e capacidade migratória de neutrófilos. 161f. Tese (Mestrado). Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2012.

PALMEIRO M, CHERUBINI K, YURGEL LS. Paracoccidioidomycosis – Literature Review. **Scientia Medica.** 15(4):275-278. 2005.

PATRICK, S. M. *et al.*. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p.249-270, 2005.

PEREIRA, R. M.; BUCARETCHI, F.; DE MELO BARISON, E.; HESSEL, G.; TRESOLDI, A.T. Paracoccidioidomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.46, p.127–131, 2004.

PIGNATARI, G.C.; TAKESHITA, D.; PARISE, C.B.; SOARES, F.A.; DE MORAES, Z.Z.; HAN, S.W. Carcinoembryonic antigen (CEA) mimicry by an anti-idiotypic scFv isolated from anti-Id 6.C4 hybridoma. **Journal of Biotechnology**. v.127, p.615-625, 2007.

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

PORTER, G.W.; YI, W.; DENZIN, L.K. TLR agonists downregulate H2-O in CD8alpha-dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v.187, p.4151-60, 2011.

PRADO, M.; DA SILVA, M.B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: review from 1996-2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, p. 513-521, 2009

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

PUCCIA, R., L. R. TRAVASSOS. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **J. Clin. Microbiol.** 29:1610-1615. 1991.

- PUCCIA, R., S. SCHENKMAN, P. A. GORIN, AND L. R. TRAVASSOS. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect. Immun.** 53:199-206. 1986.
- R. A.; VAZ, C. A. C.; FRANCO, M. F.; CALICH, V. L. G. Dual role of IL-4 in pulmonary paracoccidioidomycosis: Endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infect. Immun.**, v.72, p. 3932–3940, 2004.
- R. W. STRUBE AND S. Y. CHEN, “Characterization of anti-cyclin E single-chain Fv antibodies and intrabodies in breast cancer cells: enhanced intracellular stability of novel sFvFc intrabodies,” **Journal of Immunological Methods**, vol. 263, no. 1-2, pp. 149–167, 2002.
- RAJPUT, Y.S, SODHI, R., VERMA, N.K. Anti-idiotypic Antibodies against bovine growth hormone. **Asian Australas J Anim Sci.** 16:732–737. 2003.
- REIS, C.P, NEUFELD, R.J, RIBEIRO, A.J, VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 2:8-21. 2006.
- RESTREPO, A., ESPINAL, L.S. Algunas consideraciones ecológicas sobre la paracoccidioidomycosis em Colômbia. **Antioquia médica.** 18:433-46. 1968,
- RESTREPO, A.; BENARD, G.; DE CASTRO, C.C.; AGUDELO, C.A.; TOBON, A.M. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Semin. Respir. Crit. Care Med.** v.29, p.182–197, 2008.
- RESTREPO, A.; McEWEN, J.G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycology**, v.39, p.233–241, 2001.
- RESTREPO, A.; MONCADA, L.H. Characterization of the precipitin bands detected in immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. **Applied Microbiology**, v.28, p.138-144, 1974.
- RESTREPO, A.; MONCADA, L.H. Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion test for the serological diagnoses of paracoccidioidomycosis. **Applied Microbiology**, v.24, p.132-137, 1972.
- RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E.; STOVER, E.P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D.A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v.26, p.346-345, 1984.
- RESTREPO, A.; TOBON, A.; AGUDELO, C. Paracoccidioidomycosis, *In* HOSPENTHAL, D.; RINALDI, M. (ed.), Diagnosis and treatment of human mycoses. **Humana Press.** p. 331–342, 2008.
- RESTREPO, A.; TOBON, A.M. *Paracoccidioides brasiliensis*, *In* MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. (ed.) Mandell, Douglas and Bennett’s principles and practice of infectious diseases. **Elsevier** vol.7, p.3357–3363, 2009.

- RESTREPO-MORENO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M. F.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. (Eds.). *Paracoccidioidomycosis*. **Boca Ratón: CRS Press**, p.121-128, 1994.
- RICHINI-PEREIRA, V.B.; BOSCO, S.M.G.; THEODORO, R.C.; MACORIS, S.A.G.; BAGAGLI, E. Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, p.636-640, 2009.
- ROBERGE, S., WILKIE, B.N, WALTON, J.S. Anti-idiotypic responses of lactating cows immunized with monoclonal antibodies against bovine somatotropin. **J Dairy Sci**. 82:1707–1715. 1999
- ROMAGNANI, P., F. ANNUNZIATO, E. LAZZERI, L. COSMI, C. BELTRAME, L. LASAGNI, G.GALLI, M. FRANCALANCI, R. MANETTI, F. MARRA, V. VANINI, E. MAGGI, S. Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alphabeta+ CD8+ single-positive T cells, TCRgammadelta+ T cells, and natural killertype cells in human thymus. **Blood** 97:601-7. 2001.
- ROMANI, L. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. **Med Mycol**, 1-15. 2008
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 4, p.275-288. 2011.
- ROMANI, L., PUCCETTI, P. Controlling pathogenic inflammation to fungi. **Expert Rev Anti Infect Ther**. 5(6):1007-17. 2007
- ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; PUCETTI, P.; BISTONI, F. Neutrophils production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 Therapy in neutropenic mice. **J. Immunol.**, v. 158, p. 5349, 1997.
- ROMANO, C.C. *et al.*. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigenspecific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine**, v. 18, p.149-157. 2002.
- SADAHIRO A, DIOGO CL, OSHIRO TM, SHIKANAI-YASUDA MA. Kinetics of INF-  $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-4 production by mononuclear cell stimulated with gp43 peptides in patients cured of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**. 40(2):156-162. 2007.
- SALAZAR, M.E.; RETRESPO, A.; SETEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium to yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infection and Immunity*, v.56, p.711-713, 1988.
- SANTOS-MAGALHÃES, N. S., PONTES, A., PEREIRA, V. M. W., CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzantine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v.208, p.71-80, 2000.

SCHICK, M.R, DREESMAN, G.R, KENNEDY, R.C. Induction of an anti-hepatitis B surface antigen response in mice by noninternal image (Ab2 alpha) anti-idiotypic antibodies. **J Immunol** 138:3419–3425. 1987.

SHAFFAZICK, S.R. *et al.*. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova.** 26: 726-737, 2003.

SHIKANAI-YASUDA, M.A, FILHO, F.Q.T, MENDES, R.P, COLOMBO, A.L, MORETTI, M.L. Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop.** 39(3):297-310.2006

SHOME, S. K.; BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* In the soil of Recife (Brazil). **Rev. Fac. Med. Uni. Ceara.** v.3: 90–94. 1963

SHU M, XU Y, WANG D, LIU X, LI Y, HE Q, TU Z, QIU Y, JI Y, WANG X. Anti-idiotypic nanobody: A strategy for development of sensitive and green immunoassay for Fumonisin B<sub>1</sub>. **Talanta.** 2015 Oct 1;143:388-93. doi: 10.1016/j.talanta.2015.05.010.

SILVA, J.S. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **American Journal of Pathology**, v.156, p.1811-1820, 2000.

SILVA-VERGARA, M. L. *et al.*. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 37-42, Feb. 1998.

SILVA-VERGARA, M. L. *et al.*. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* form armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol.** v.38. p.193-9. 2000.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R. Inquérito epidemiológico com paracoccidioidina e histoplasmina em área agrícola de café em Ibiá, Minas Gerais, Brasil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 15, n. 4, p. 294-297, Dec. 1998.

SINGER-VERMES, L. M., CALDEIRA, C. B., BURGER, E., CALICH, V. L. G. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clin. Exp. Immunol.**, 94; 75-79, 1993

SMITH, R. M. DUNCAN, M. J. MOPIR, D. T. Heterologous protein secretion from yeast. **Science Direct**, 229: 1219-1224, 1985.

SOARES CM, MADLUN EE, DA SILVA SP, PEREIRA M, FELIPE MS. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **J Clin Microbiol.** 33(2): 505-7. 1995.

SOUTO, J.T.; ALIBERTI, J.C.; CAMPANELLI, A.P.; LIVONESI, M.C.; MAFFEI, C.M.; FERREIRA, B.R.; TRAVASSOS, L.R.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*

infected mice is modulated by interferon-gamma. **Am. J. Pathol.**, v. 163(2), p. 583-590, 2003.

SOUTO, J.T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M.A.; SOUZA, A.W.S, MESQUISTA, D.J, ARAÚJO, J.A.P, CATELAN, T.T.T, CRUVINEL, W.M, ANDRADE, L.E.C, da SILVA, N.P., O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Rev Bras Reumatol.** 50(6):665-94. 2010

SOUZA, E.B.; LOPES, J.D.; ALMEIDA, S.R. B and T cell responses elicited by monoclonal anti-idiotypic antibody (Ab2 $\beta$ ) mimicking gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin. Exp. Immunol.** v.137, p.123-128, 2004.

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

STAVNEZER, J. Antibory class switching. **Adv. Immunology**, v.61, p.79-146, 1976.

STIPSANELLI E, VALSAMAKI P. Monoclonal antibodies: old and new trends in breast cancer imaging and therapeutic approach. **Hell J Nucl Med.** 8(2):103–8. 2005.

SU, S., WARD, M.M, APICELLA, M.A *et al.*. A nontoxic, idiotypic vaccine against gramnegative bacterial infections. **J Immunol** 148:234. 1992.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M.A.; SCHREIBER, R.D.; REMINGTON, J.S. Interferongamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v.240, p.516518, 1988.

SWAIN, S.L.; WEINBERG, A.D.; ENGLISH, M.; HUSTON, G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. **J. Immunology**, v.145, p.3796-3806, 1990.

TABORDA, C. P., M. A. JULIANO, R. PUCCIA, M. FRANCO, AND L. R. TRAVASSOS. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect. Immun.** 66:786-793. 1998.

TEIXEIRA, M.M, THEODORO, R.C, DE CARVALHO, M.J, FERNANDES, L., PAES, H.C.

Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol** 52: 273-283. 2009

TEIXEIRA, M.M, THEODORO, R.C, OLIVEIRA, F.F, MACHADO, G.C, HAHN, R.C, *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Med Mycol** 52: 19–28. 2014.

TERÇARIOLI, G., BAGAGLI, E., REIS, G., THEODORO, R., BOSCO, S., MACORIS, S., RICHINI-PEREIRA, V. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiology.** 7(1): 92. 2007

THANAVALA YM, BROWNSE, HOWARD CR. Surrogate hepatitis B virus antigenic epitope represented by a synthetic peptide and an internal image antiidiotypic antibody. **J Exp Med.** 164:227–236. 1986.

THANAVALA, Y.M, ROITT, I.M. Monoclonal anti-idiotypic antibodies as surrogates for hepatitis B surface antigen. **Int Rev Immunol** 1:27–39. 1986

THEODORO, R. C., CANDEIAS, J. M., ARAUJO, J. P., JR., BOSCO SDE, M., MACORIS, S. A., PADULA, L. O., FRANCO, M., BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med Mycol** 43(8): 725-9. 2005

TRAVASSOS, L. R. Immunochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens, p. 6786. In M. Franco, C. S. Lacaz, A. M. Restrepo, and G. Del Negro (ed.), *Paracoccidioidomycosis*. **CRC Press**, Boca Raton, Fla. 1994.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol** 3:133-46. 2003.

TURNER, S. M. *et al.* Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 263, p. 10-20, 1997.

UTTENREUTHER-FISCHER, M.M., *et al.* Molecular characterization of the anti-idiotypic immune response of a relapse-free neuroblastoma patient following antibody therapy: a possible vaccine against tumors of neuroectodermal origin? **J. Immunol.** 176: 7775-7786. 2006.

VARELA, F. J., COUTINHO, A. “Second Generation Immune Networks”, **Imm. Today**, 12(5), pp. 159-166. 1991

VICENT, M.J., DUNCAN, R. Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer. **Trends in Biotechnology.** 24(1):39-47. 2006.

W. J. J. FINLAY, L. SHAW, J. P. REILLY, AND M. KANE, “Generation of high-affinity chicken single-chain Fv antibody fragments for measurement of the *Pseudonitzschia pungens* toxin domoic acid,” **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 72, no. 5, pp. 3343–3349, 2006.

WAN, L. *et al.* High-level expression of a functional humanized single-chain variable fragment antibody against CD25 in *Pichia pastoris*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 81, p.33-41, 2008.

WANG, B.S, ZHANG, R.J, BONA, C.A, MORAN, T.M. Promotion of animal growth with a monoclonal anti-idiotypic specific to anti-porcine growth hormone antibody. **Mol Immunol.** 31:651–656. 1994.

WANKE, B.; AIDE, M.A. Paracoccidioidomycose. **J. bras. pneumol.**, v.35, n.12, p. 12451249, 2009.



WILLIAMS, M.A.; TYZNIK, A.J.; BEVAN, M.J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8 memory T cells. **Nature**. V.441, p.890-893, 2006.

WINTHROP, M.D., DENARDO,S.J., ALBRECHT,H., MIRICK,G.R., KROGER,L.A., LAMBORN,K.R., VENCLOVAS,C., COLVIN,M.E., BURKE,P.A. AND DENARDO,G.L. **Clin. Cancer Res.**, 9, 3845s–3853s. 2003

WORN, A., PLUCKTHUN, A. Stability engineering of antibody single-chain fv fragments. **J. Mol. Biol.**, v. 305, p.989-1010, 2001.

X. HU, R. O'DWYER, AND J. G. WALL, “Cloning, expression and characterisation of a single-chain Fv antibody fragment against domoic acid in *Escherichia coli*,” **Journal of Biotechnology**, vol. 120, no. 1, pp. 38–45, 2005.

X. K. DENG, L. A. NESBIT, AND K. J. MORROW JR., “Recombinant single-chain variable fragment antibodies directed against *Clostridium difficile* toxin B produced by use of an optimized phage display system,”**Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, vol. 10, no. 4, pp. 587–595, 2003.

X. LI, P. STUCKERT, I. BOSCH, J. D. MARKS, AND W. A. MARASCO, “Single-chain antibody-mediated gene delivery into ErbB2-positive human breast cancer cells,” **Cancer Gene Therapy**, vol. 8, no. 8, pp. 555–565, 2001.

YOKOTA, T., MILENIC, D.E, WHITLOW, M., SCHLOM, J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. **Cancer Res.** 52:3402–3408. 1992

ZELANTE, T., A. DE LUCA, P. BONIFAZI, C. MONTAGNOLI, S. BOZZA, S. MORETTI, *et al.*. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. **Eur J Immunol**, 37 (10):2695-706. 2007

ZHANG, J.L, GOU, J.J, ZHANG, Z.Y, JING, Y.X, ZHANG, L, GUO, R., YAN, P, CHENG, N.L, NIU, B., XIE, J. Screening and evaluation of human single-chain fragment variable antibody against hepatitis B virus surface antigen. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int.** May;5(2):237-41. 2006

ZHOU, E.M, CHANH, T.C, DREESMAN, G.R. Immune response to human immunodeficiency virus: in vivo administration of anti-idiotypic induces an anti-gp 160 response specific for a synthetic peptide. **J Immunol** 139:2950–2956. 1987

ZHOU, E.M, LOHMAN, K.L, KENNEDY, R.C. Administration of noninternal image monoclonal anti-idiotypic antibodies induces idiotypic-restricted responses specific for human immunodeficiency virus envelope glycoprotein epitopes. **Virology** 174:9–17. 1990

ZHOU, Y., FISHER, S.J, JANATPOUR, M, GENBACEV, O., DEJANA, E., WHEELLOCK, M., DAMSKY, C.H. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? **J Clin Invest.** 99: 2139-51, 1997.





UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 117.2014-P447

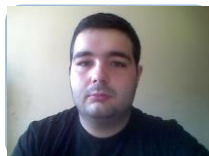
## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa “**Estudo dos efeitos da terapia de scFv que mimetiza o antígeno gp43 de Paracoccidioides brasiliensis conjugado a nanocápsulas na paracoccidioidomicose experimental**” (Protocolo CEUA/FCF/447), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Roney Henrique Pereira**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Karen Spadari Ferreira**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **12 de setembro de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 11 de novembro de 2014.

**Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**  
Coordenador da CEUA/FCF/USP





## Roney Henrique Pereira

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7698976835317782>  
Última atualização do currículo em 20/02/2015

Formado em Ciências Biológicas - Licenciatura, pelo Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (PUC-CES/JF). Monitor por 2 anos das disciplinas de Química e Bioquímica pelo PUC-CES/JF, com iniciação científica em Entomologia também pela PUC-CES/JF Bolsista CNPq com atuação na área de Entomologia Agrícola pela Embrapa Gado de Leite. Bolsista FAPEMIG no Instituto de Laticínios Candido Tostes. Atualmente, cursando Mestrado em Análises Clínicas no departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo - USP. (Texto informado pelo autor)

## Identificação

Nome


Roney Henrique Pereira Nome em citações bibliográficas



PEREIRA, R. H.

## Endereço

## Formação acadêmica/titulação

2013	Mestrado em andamento em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Estudo dos efeitos da terapia de scFv que mimetiza o antígeno gp43 de Paracoccidoides brasiliensis conjugado à nanocápsulas na paracoccidoidomicose experimental, Orientador:  Karen Spadari Ferreira. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Biologia e Fisiologia dos Microorganismos / Especialidade: Micologia. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia / Subárea: Imunologia Celular.
2009	Graduação em andamento em Ciências Biológicas. Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, CESJF, Brasil.
2005 - 2007	Ensino Médio (2º grau). Colégio e Curso Conexão.

## Formação Complementar

2011	Citogenética e suas aplicações em pesquisas. (Carga horária: 8h). Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, CESJF, Brasil.
2010 - 2010	Genética Forense. (Carga horária: 8h). Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, CESJF, Brasil.
2010 - 2010	Transgênicos. (Carga horária: 8h). Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, CESJF, Brasil.
2010 - 2010	DNA, Genética e Justiça. (Carga horária: 8h). Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, CESJF, Brasil.
2009 - 2009	Infecção por T.Cruzi. (Carga horária: 20h).

2009 - 2009

Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, CESJF, Brasil.

Simpósio de Biologia. (Carga horária: 20h).

Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, CESJF, Brasil.

## Atuação Profissional

---

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Mestrando, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações Mestrado em Análises Clínicas no departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo - USP.

## Projetos de extensão

---

2013 - Atual

Estudos dos efeitos da terapiaq de scFv que mimetiza o antígeno gp43 de Paracoccidioides brasiliensis conjugado à nanocápsulas na paracoccidioidomicose experimental

Descrição: Descrição: Investigar o efeito da terapia com scFv de Paracoccidioides brasiliensis conjugado a nanopartículas, avaliando os efeitos dessa imunização na PCM experimental...

Situação: Em andamento; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Roney Henrique Pereira - Integrante / Karen Spadari Ferreira Coordenador / Grasielle Pereira Jannuzzi - Integrante.

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro.

## Áreas de atuação

---

### Idiomas

---

Espanhol

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Pouco.

Português

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Inglês

Compreende RazoavelmenteLê Razoavelmente.

## Produções

---

Produção bibliográfica

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. ★ AUAD, A. M. ; PEREIRA, R. H. ; BORGES, R. A. ; FRIAS, M. P. ; RESENDE, T. T. . . Impacto da temperatura nos estágios de ovo e ninfa de Mahanarva spectabilis (Distant, 1909) e Deois schach (Frabricius, 1787) (Hemiptera: Cercopidae).. In: IV Workshop de Iniciação Científica do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite Juiz de Fora., 2010, Juiz de Fora. Anais do IV Workshop de Iniciação Científica do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite Juiz de Fora., 2010.

Resumos publicados em anais de congressos

1. AUAD, A. M. ; RESENDE, T. T. ; PEREIRA, R. H. ; MACHADO, V. S. ; FERREIRA, R. B. ; BRAGA, A. L. F. . LEVANTAMENTO DE FORMIGAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) EM AMBIENTE SILVIPASTORIL. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 2011, Uberlândia. LEVANTAMENTO DE FORMIGAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) EM AMBIENTE SILVIPASTORIL, 2008.
2. ★ AUAD, A. M. ; RESENDE, T. T. ; CARVALHO, C. A. ; MONTEIRO, P. H. ; PEREIRA, R. H. . Duração e viabilidade préimaginal de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) alimentadas de *Sipha flava* (Forbes, 1884) submetidas a diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>.. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 2010, Natal. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2010, Natal., 2010.
3. ★ FERREIRA, R. B. ; MORAES, J. C. ; AUAD, A. M. ; RESENDE, T. T. ; PEREIRA, R. H. . Sobrevivência de *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) em genótipos de braquiária submetidos a diferentes níveis de CO<sub>2</sub>. In: XXIII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2010, Natal. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2010., 2010.
4. ★ AUAD, A. M. ; RESENDE, T. T. ; PEREIRA, R. H. ; MACHADO, V. S. ; FERREIRA, R. B. ; BRAGA, A. L. F. . Levantamento populacional de formigas em ambiente silvipastoril. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 2010, Natal. Anais do XIII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2010.

#### Apresentações de Trabalho

1. ★ AUAD, A. M. ; PEREIRA, R. H. ; BORGES, R. A. ; FRIAS, M. P. ; RESENDE, T. T. . Impacto da temperatura nos estágios de ovo e ninfa de *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) e *Deois schach* (Fabricius, 1787) (Hemiptera: Cercopidae).. 2010. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

## Bancas

---

Participação em bancas de comissões julgadoras

#### Outras participações

1. PEREIRA, R. H.. Expo Ciências 2011. 2011. Centro Integrado Arco - iris.
2. PEREIRA, R. H.. Feira das Ciências. 2011. Colégio Nossa Senhora do Carmo.

## Eventos

---

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. I Seminário de Etnofarmacologia. 2011. (Seminário).
2. Segunda Jornada de Divulgação Científica - Terra: Um planeta dinâmico. 2011. (Outra).
3. Segunda Jornada de Divulgação Científica - Amor, Ciência, as utopias da Modernidade e suas origens. 2011. (Outra).
4. Segunda Jornada de Divulgação Científica - O que faz um cientista.. 2011. (Outra).
5. Segunda Jornada de Divulgação Científica - Combate ao desperdício de energia para redução de Impactos Ambientais. 2011. (Outra).

6. Segunda Jornada de Divulgação Científica - Aprender Química no cinema. É possível?. 2011. (Outra).
7. As diferentes áreas de atuação do Biólogo - experiências e perspectivas. 2011. (Outra).
8. Reciclagem do lixo eletrônico - você sabe onde descartar ?. 2011. (Outra).
9. A importância da Biologia na formação do professor. 2011. (Outra).
10. VI Simpósio de Ciências Biológicas. 2010. (Simpósio).
11. Simpósio, Licenciaturas: Realidade e Perspectivas. 2010. (Simpósio).
12. Conferência DNA, Genética e Justiça. 2010. (Outra).
13. V Simpósio de Ciências Biológicas. 2009. (Simpósio).
14. II Feira de Profissões.A Biologia no cotidiano. 2009. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. PEREIRA, R. H. ; LORENA, . VI Simpósio de Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. 2010. (Exposição).

## Outras informações relevantes

---

Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/IC na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Leite, Laboratório de Entomologia, no período de 08/03/2010 a 31/07/2010. Bolsista BIC/FAPEMIG na Empresa Instituto de Laticínio Candido Tostes desde 01/03/2012 - Projeto: DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE PROTEÓLISE DE QUEIJO MINAS PADRÃO PARA DEFINIÇÃO DO PERÍODO DE MATURAÇÃO. Orientadora: Danielle Braga Chelini Pereira.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 22/02/2015 às 1:01:48





Login NUSP: 8723175 Nome: Roney Henrique Pereira

Aluno(a)  
Roney Henrique Pereira  
NUSP : 8723175  
Sair

## Ficha do Aluno

Curso	Área	Nº Sequencial	Situação	Visualizar
→ Mestrado Análises Clínicas (9136)		1	Matrícula de Acompanhamento	

Preparar para imprimir

### Apresentação

- Apresentação
- Vídeos tutoriais

### + Acesso público

+ Senha

+ Pessoa

### + Informações pessoais

#### - Aluno regular

- Ficha do aluno
- Bolsas
- Emissão de documentos
- Validação de dados

### + PAE

### + Matrícula

### + Cartões USP

- Mapa do site
- E-mails automáticos
- Egressos USP

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

### FICHA DO ALUNO

#### 9136 - 8723175/1 - Roney Henrique Pereira

**Email:** rhpbio@usp.br  
**Data de Nascimento:** 03/02/1990  
**Cédula de Identidade:** RG - MG-13.765.103 - MG  
**Local de Nascimento:** Estado de Minas Gerais  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Licenciado em Ciências Biológicas - Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora - Minas Gerais - Brasil - 2012

**Curso:** Mestrado  
**Programa:** Farmácia (Análises Clínicas)  
**Área:** Análises Clínicas  
**Data de Matrícula:** 17/07/2013  
**Início da Contagem de Prazo:** 17/07/2013  
**Data Limite para o Depósito:** 18/01/2016  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Karen Spadari Ferreira - 17/07/2013 até o presente. Email: karensf@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 17/07/2013  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 16/09/2014  
**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Título do Trabalho:**  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:**  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**

**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 17/07/2013

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

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 04/08/2015

**Impresso em:** 01/10/2015 12:15:36



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

**Documento sem validade oficial**

**FICHA DO ALUNO**

**9136 - 8723175/1 - Roney Henrique Pereira**

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
FBC5757-4/2	Tópicos em Análises Clínicas II	06/08/2013	18/11/2013	15	1	87	A	N	Concluída
ICB5709-6/1	Ensaio Pedagógico (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	12/08/2013	15/09/2013	45	3	80	C	N	Concluída
BMM5777-3/1	Culturas Celulares e Suas Aplicações em Microbiologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	20/08/2013	23/09/2013	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MCM5897-1/5	MHC e Resposta Imune (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	14/10/2013	27/10/2013	30	2	100	B	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0517 - Diagnóstico Laboratorial das Doenças Infecciosas e Parasitárias, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/02/2014	30/06/2014	-	3	-	-	-	-
FBC5705-4/4	Tópicos em Microscopia Quantitativa	03/02/2014	09/02/2014	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BMI5881-4/2	Regulação da Resposta Imune (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	10/03/2014	12/05/2014	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5793-12/1	Tópicos em Análises Clínicas I	11/03/2014	23/06/2014	15	1	80	A	N	Concluída
MCM5772-6/4	Temas Básicos de Imunologia (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	31/03/2014	27/04/2014	60	4	80	A	N	Concluída
FBC5748-4/1	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	08/04/2014	19/05/2014	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5766-4/1	Tópicos em Análises Clínicas IV	05/08/2014	17/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída
BMI5863-7/3	Seminário Didático-Científico em Imunologia II (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	14/08/2014	26/11/2014	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MCM5830-5/1	Mecanismos Imunopatológicos nas Doenças Parasitárias (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	01/09/2014	28/09/2014	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5722-2/3	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	02/09/2014	22/09/2014	60	4	75	B	N	Concluída
BMI5814-4/1	Avanços em Imunobiologia do Linfócito T (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	08/09/2014	26/09/2014	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5709-5/2	Biologia Molecular em Análises Clínicas	22/09/2014	27/10/2014	75	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5710-6/2	Antígenos Recombinantes: Aplicação em Diagnóstico e Desenvolvimento de Vacinas	02/11/2014	22/11/2014	60	4	100	B	N	Concluída
BMP5773-3/1	Bases Imunológicas da Relação Parasita-Hospedeiro (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/03/2015	29/04/2015	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MCM5712-5/7	Tópicos Avançados em Imunologia (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	05/03/2015	13/05/2015	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
EDM5092-2/1	A Educação Ambiental e a Formação de Professores, via Pesquisa Interdisciplinar (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	17/03/2015	08/06/2015	120	8	75	B	N	Concluída
BIP5700-7/1	Preparação Pedagógica em Biologia (Instituto de Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	04/05/2015	24/05/2015	45	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
BMI5841-6/1	Tópicos Avançados em Imunologia Fundamental (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/05/2015	24/05/2015	45	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
MIP5737-2/3	Fundamentos da Citometria de Fluxo - Aplicações na Investigação da Relação Hospedeiro-Parasita (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	15/06/2015	21/06/2015	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
<b>Disciplinas:</b>	0	25	31
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	25	31

**Créditos Atribuídos à Dissertação: 71**

**Observações:**

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 02/03/2015.

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

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.  
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 04/08/2015

**Impresso em:** 01/10/2015 12:15:36

