

Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular
Imunologia Aplicada

.....
Vacina de DNA (*hsp65 M. Leprae*) para Paracoccidioidomicose Experimental:
Atividade Imunogênica e Terapêutica
.....

Alice Melo Ribeiro

Brasília-DF
Março/2008

Alice Melo Ribeiro

**Vacina de DNA (*hsp65 M. Leprae*) Para Paracoccidioidomicose Experimental:
Atividade Imunogênica e Terapêutica**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutor em Patologia Molecular.

Orientadora: Prof^a.Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Sueli Soares Felipe

Brasília-DF
Março/2008

Agradecimentos

“Você se fez presente em todos os momentos firmes ou trêmulos e, passo a passo, pude sentir a Sua mão na minha, transmitido-me a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir... A Sua presença é qualquer coisa como a luz e a vida, e eu sinto que em meu gesto existe o seu gesto e em minha voz, a Sua voz”.

Vinícius de Moraes

Ao querido **Ademir** e aos meus *pequenos grandes* filhos **Clarice e Arthur**

Ao meu **Ademir**, meu grande amor e companheiro, dedico este trabalho que faz parte da nossa vida, da nossa história, dos nossos dias, noites, sonhos e projetos. Obrigada pela beleza de sentimento que há entre nós dois, pela sua simplicidade e objetividade de querer ser feliz comigo e nada mais. Meu amor é grande, sincero, grato e eterno.

Aos meus filhos que me ensinaram a ver que a vida é para ser vivida e não *dormida*. Mas, sempre me esperam na sala, felizes, transbordando alegria, querendo sempre estar comigo. Sou grata e agradeço por serem tão maravilhosos e cheios de vida. Ao Arthur, em especial, por ter nascido, ou melhor, *renascido*, durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais pelo dom da vida, revestida com carinho e dedicação. Obrigada pela minha infância alegre, pela oportunidade que me deram de crescer e estar aqui hoje. Obrigada por serem os meus pais.

Às minhas irmãs, por formarem comigo um quarteto cheio de diferenças, esperanças, ilusões e desilusões. Precisamos perseverar sempre.

À D. Regina, Rosângela e Almir pelo carinho e atenção em todos os momentos

À **Professora Anamélia** por ter acreditado neste trabalho, no meu trabalho e potencial, pelas portas abertas, pelo carinho, pelas atitudes positivas *sempre*, palavras corretas na hora certa. Muito obrigada!

À **Professora Sueli** pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pelo voto de confiança e dedicação. Muito obrigada!

À **Professora Sonia Freitas**, *minha primeira orientadora de doutorado*, por ser um exemplo de mulher, feliz, capaz de mudar o nosso dia. Guardo suas mensagens com muito carinho, suas palavras carinhosas.

Obrigada Professora Sonia !

Ao Professor **Célio Lopes Silva** pelo apoio durante este trabalho e pela oportunidade de continuidade. Muito obrigada !

Aos membros da banca pelas contribuições muito bem-vindas e pela participação nesta etapa tão importante da minha vida: Prof. **Carlos Taborda**, Dr. **Gustavo Romero**, Prof. **Fernando Araripe**, Profa. **Andréa Maranhão** e Profa. **Ildinete Pereira**.

Aos meus amigos **Bruno Cobucci e João Ricardo** que estão longe, mas não deixarão de ser os meus amigos queridos da UnB.

Aos colegas da **Biologia Molecular**, que passaram comigo dias frios, quentes, momentos felizes e não tão felizes. Pela ajuda na bancada, pela ajuda na hora certa. Muito obrigada! À Fátima e D. Ivonildes que estiveram sempre presentes.

Aos amigos da **Patologia**, que fizeram do *pequeno laboratório*, um grande ambiente. À todos um muito obrigada. André, Cecília, Ana Camila, Janaína, Isaque, Yanna, Flávia, Keila e todos os meus companheiros de bancada no

laboratório de Patologia, obrigada pelo carinho e pela ajuda. Ao **Prof. Jaime Santana** pelas contribuições e apoio.

Aos **funcionários do biotério e da limpeza** que acompanharam

este trabalho de perto! À **Francisca**, em especial, que me acompanha desde o mestrado e gosta sempre de trocar algumas palavras especiais.

À **Universidade de Brasília**, que há 12 anos entrou na minha vida e espero que nunca saia ! Agradeço todos os dias que passei na graduação, no mestrado e agora, no doutorado.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro

Enfim, tenho apenas **ALEGRIAS!**

Este caminho foi percorrido por todos aqueles que, junto comigo, **ACREDITARAM DE VERDADE.**

Sumário

Índice de Figuras	VII
Índice de Tabelas	X
Lista de abreviaturas	XI
Resumo	XIII
<i>Abstract</i>	XIV
I. Introdução	1
1. Vacina de DNA	1
2. Doenças Fúngicas e Vacina de DNA	2
3. Paracoccidioidomicose	4
4. HSPs e Vacina de DNA	7
5. Vacina de DNA –<i>hsp65</i> de <i>Mycobacterium leprae</i>	9
II. Objetivos	10
III. Materiais e Métodos	11
1. Preparação da vacina de DNA – <i>hsp65</i>	11
1.1 Plasmídeo DNA- <i>hsp65</i>	11
1.2 Amplificação e purificação plasmidial	11
2. Preparação e administração do inóculo de <i>P brasiliensis</i>	12
2.1 Preparo do inóculo	12
2.2 Via de administração e dose de infecção	12
3. Animais de experimentação	12

4. Grupos e ensaios experimentais	12
4.1 Ensaio de Imunização	13
4.2 Ensaio de Tratamento	14
5. Eutanásia dos animais, retirada e armazenamento dos órgãos	15
6. Análise da evolução da doença	15
7. Análise da resposta imunológica	16
7.1 Ensaio de proliferação de esplenócitos	16
7.2 Dosagem de citocinas e anticorpos (IgG1 e IgG2a)	17
7.3 Dosagem da concentração de NO ₃ e NO ₂)	17
8. Western Blot	18
9. Reprodutibilidade experimental e Análise estatística	18
IV. Resultados	20
1. Imunização com a vacina DNA - <i>hsp65</i>	20
1.1 Análise histopatológica e Recuperação/Quantificação fúngica pulmonar	20
1.2 Padrão de resposta imunológica	22
1.2.1 Capacidade linfoproliferativa	22
1.2.2 Produção de citocinas e imunoglobulinas	23
1.2.3 Produção de NO ₃ e NO ₂	27
2. Tratamento com a vacina <i>hsp65</i> (DNA-<i>hsp65</i>)	28
2.1 Análise histopatológica e Recuperação/Quantificação fúngica pulmonar .	28

2.2 Padrão de resposta imunológica	30
2.2.1 Capacidade linfoproliferativa	30
2.2.2 Produção de citocinas e imunoglobulinas	31
2.2.3 Produção de NO ₃ e NO ₂	34
3. <i>Western Blot</i>	34
V. Discussão	36
VI. Conclusão	41
VII. Produção Durante o Doutorado	42
VIII. Perspectivas	44
IX. Anexos	45
X. Referências Bibliográficas	84

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismo de ação das vacinas de DNA	2
Figura 2. Mecanismo de ação dos complexos HSP-antígenos	8
Figura 3. Mapa do vetor de expressão pVAX1	11
Figura 4. Protocolo experimental dos ensaios de imunização com vacina DNA- <i>hsp65</i> 30 ou 60 dias após a infecção com <i>P. brasiliensis</i>	14
Figura 5. Protocolo experimental dos ensaios de tratamento com a vacina DNA- <i>hsp65</i> após infecção com <i>P. brasiliensis</i>	15
Figura 6. Cortes histológicos de animais imunizados com a vacina DNA- <i>hsp65</i> e infectados com <i>P. brasiliensis</i>	21
Figura 7. Quantificação fúngica pulmonar em animais imunizados e infectados com <i>P. brasiliensis</i>	22
Figura 8. Resposta proliferativa de cultura de esplenócitos obtidos de camundongos imunizados com a vacina DNA- <i>hsp65</i> e infectados com <i>P. brasiliensis</i>	23
Figura 9. Padrão de citocinas secretadas após a imunização com vacina DNA- <i>hsp65</i> em animais infectados com <i>P. brasiliensis</i>	24

- Figura 10.** Níveis de IgG2a e IgG1 (reação com rHSP65) em soro de animais imunizados com a vacina DNA-*hsp65* e infectados com *P. brasiliensis* 27
- Figura 11.** Produção de Óxido Nítrico (NO) em sobrenadantes de culturas de esplenócitos (NO₂) e soro (NO₃) de animais imunizados e infectados com *P. brasiliensis* 28
- Figura 12.** Cortes histológicos de animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com a vacina DNA-*hsp65* 29
- Figura 13.** Quantificação fúngica pulmonar em animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com a vacina DNA-*hsp65* 30
- Figura 14.** Resposta proliferativa de cultura de esplenócitos obtidos de camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com a vacina DNA-*hsp65* 31
- Figura 15.** Padrão de citocinas secretadas após o tratamento com vacina DNA-*hsp65* em animais infectados com *P. brasiliensis* 32
- Figura 16.** Níveis de IgG2a e IgG1 (reação com HSP65 recombinante) em soro de animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com a vacina DNA-*hsp65* 33
- Figura 17.** Produção de Óxido Nítrico (NO) em sobrenadantes de culturas de esplenócitos (NO₂) e soro (NO₃) de animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com a vacina DNA-*hsp65* 34

Figura 18. Análise da produção de anticorpos de animais imunizados ou tratados com a vacina DNA-*hsp65* e infectados com *P. brasiliensis* (*Western Blot*)

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Antígenos ou imunógenos e seus possíveis mecanismos de proteção estudados em fungos	3
Tabela 2. Produção de TNF- α em animais após a imunização com vacina DNA- <i>hsp65</i> e infectados com <i>P. brasiliensis</i>	25
Tabela 3. Produção de citocinas após a imunização com vacina DNA- <i>hsp65</i>	26
Tabela 4. Produção de TNF- α após o tratamento com vacina DNA- <i>hsp65</i>	33

Lista de Abreviaturas

Anf B- Anfotericina B

°C- Graus Celsius

CD- Células dendríticas

CPM- Contagem de pulsos por minuto

CTLs – Linfócitos T citotóxicos

d- dias

DNA- Ácido dextrorribonucléico

DNA-*hsp65* – Vacina de DNA composta pelo gene da proteína HSP65 clonado no vetor pVAX1.

ELISA- Ensaio de ligação imunoenzimática

Gp43 - Glicoproteína de *P. brasiliensis*

h- hora

HSP- Proteína de choque térmico

rHSP- Proteína de choque térmico recombinante

IFN- gama (γ)- Interferon gama

IgG- Imunoglobulina

IL- Interleucina

M- Molar

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade I

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro

μ g- Micrograma

PBS – Tampão salina fosfato

PCM- Paracoccidioidomicose

pH- Potencial hidrogeniônico

rpm- Rotações por minuto

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS

SEM – Desvio padrão da média

Th – Células T auxiliares

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UFCs – Unidades formadoras de colônias

μg – Micrograma

μL - Microlitro

μM - Micromolar

Resumo

As proteínas de choque térmico (HSPs) são reconhecidas como importantes moléculas na modulação do sistema imunológico e são altamente conservadas entre os diferentes organismos. A vacina DNA-*hsp65* de *Mycobacterium leprae* demonstrou efeitos profiláticos e imunoterapêuticos contra diversas doenças como, por exemplo, tuberculose, artrite e leishmaniose. Neste trabalho, avaliamos a eficácia e o potencial imunomodulador na imunização e no tratamento de camundongos infectados experimentalmente com o fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*, o agente etiológico da Paracoccidioidomicose, a mais importante micose endêmica na América Latina. A vacina DNA-*hsp65* conferiu proteção aos animais contra o *P. brasiliensis* em ensaios de imunização ou de tratamento como indicado por: redução significativa no pulmonar fúngica carga (UFCs); diminuição da perda da função pulmonar e na presença de colágeno em granulomas (revelada por análises histológicas do tecido pulmonar); reestabelecimento proliferativo das células de baço; perfil de resposta imunológica de padrão Th1 com níveis elevados de IL-12, IFN - γ , TNF- α e IgG2a e baixos níveis de IL-4, IL-10 e IgG1. Esses dados, em conjunto, indicam que, em BALB/c, tanto a imunização como o tratamento com a vacina DNA-*hsp65* conferem proteção no curso da Paracoccidioidomicose. Nossos resultados abrem novas perspectivas sobre a prevenção e tratamento para outras micoses sistêmicas.

Palavras-chave: Vacina de DNA, DNA-*hsp65*, *Paracoccidioides brasiliensis*.

Abstract

Heat shock proteins (HSPs) are recognized as important molecules in the modulation of the immune system and are highly conserved among different organisms. The DNA-*hsp65* vaccine from *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) has been shown to have prophylactic and immunotherapeutic effects against various diseases, for instance, tuberculosis, arthritis and leishmaniasis. In this work, we evaluated the effectiveness and immunomodulatory potential of the DNA-*hsp65* immunization and treatment in model BALB/c mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), the etiological agent of Paracoccidioidomycosis, the most important endemic mycosis in Latin America. The DNA-*hsp65* vaccine conferred protection against this pathogen for both, the prophylactic and therapeutic assays, as indicated by: a significant reduction in pulmonary fungal burden (CFUs); a decrease in pulmonary function loss and in the presence of collagen in granulomas (revealed by histological analyses of the pulmonary tissue); the reestablishment of spleen cells proliferation; the Th1 pattern immune response with higher levels of IL-12, IFN- γ , TNF- α and IgG2a and lower levels of IL-4, IL-10 and IgG1. Together, these findings indicate that, in mice, the immunization and treatment with the DNA-*hsp65* vaccine protect mice against Paracoccidioidomycosis. Our results open new perspectives on prevention and treatment of other systemic mycoses.

Keywords: DNA vaccine, DNA-*hsp65*, *Paracoccidioides brasiliensis*.

I. Introdução

1. Vacinas de DNA

Em 1776, *Edward Jenner*, sistematizou os conhecimentos empíricos sobre a proteção que alguns microrganismos geravam nos seres humanos e criou, pela primeira vez, o conceito de vacina (Razzell, 1965). Em 1885, *Louis Pasteur* produziu a primeira vacina de forma científica através de um método que podia ser produzido em larga escala (Eyquem, 1986). A eficácia dos processos de vacinação é claramente demonstrada a partir da diminuição das taxas de mortalidade por algumas doenças infecciosas e parasitárias chegando à erradicação das mesmas, como no caso da varíola, no mundo, e da poliomielite, em vários países (Saliou, 2007 e Rey e Girard, 2007).

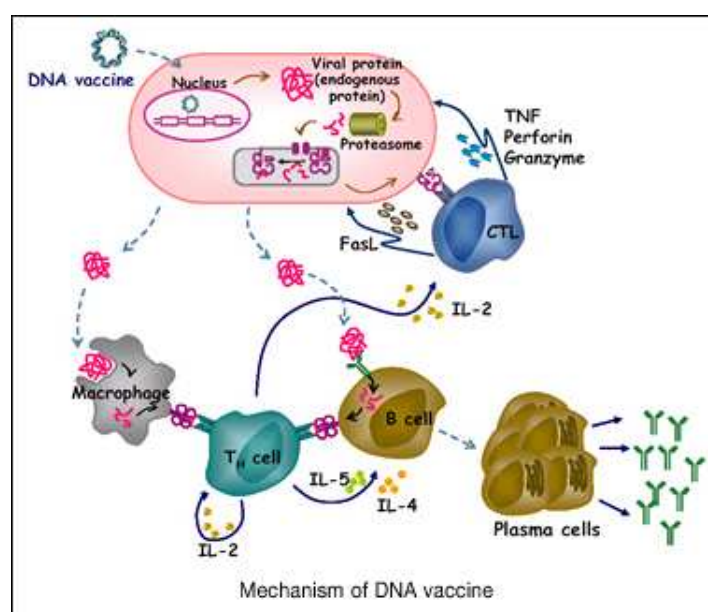
As vacinas mais tradicionais são baseadas em microrganismos vivos atenuados, microrganismos vivos inativados, extratos de microrganismos ou proteínas recombinantes (Guérin, 2007). Além dessas formas já disponíveis, encontram-se em estágio experimental as vacinas à base de peptídeos (Itoh e Yamada, 2006; Cao e colaboradores, 2008); as que utilizam microrganismos vivos recombinantes (Somboonthum e colaboradores, 2007) e as vacinas de DNA (Gu e colaboradores, 2007; Abdul-Wahid e colaboradores, 2007; Santos -Junior, 2007; Martin e colaboradores, 2007). O desenvolvimento das vacinas evoluiu muito com a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos; bem como a otimização das vias de administração e a apresentação dos antígenos às células do sistema imunológico (O'Hagan e colaboradores, 2001; Shedlock e Weiner, 2007).

As vacinas de DNA consistem em um fragmento de DNA, codificador de uma proteína imunogênica ou imunomoduladora, inserido em um vetor de expressão bacteriano e que apresenta grande potencial como agentes profiláticos e/ou terapêuticos (Webster e Robinson, 1997; Prugnaud, 2003; Coelho-Castelo e colaboradores, 2006). O gene inserido no plasmídeo, depois de administrado, codifica a proteína imunogênica nas células do indivíduo e ativa a sua memória imunológica (Silva e colaboradores, 1999; Huygen, 2003; Manoj e colaboradores, 2004; Gu e colaboradores, 2007). A primeira demonstração de que a injeção de um gene poderia ser empregada como vacina foi realizada em 1993, com a injeção intramuscular do gene que codificava uma nucleoproteína do vírus *influenza* (Ulmer e colaboradores, 1998).

Em modelo animal, as vacinas de DNA foram testadas e obtiveram sucesso contra diversos patógenos, como, por exemplo, os protozoários: *Trypanosoma cruzi*, (Rodrigues e colaboradores, 1999; Pereira-Chioccia e colaboradores, 1999; Planelles e colaboradores, 2001; Garg e Tarleton, 2002; García e colaboradores, 2006; Dumonteil E, 2007), *Leishmania major* (Coelho e colaboradores, 2006; Dumonteil E, 2007), *Giardia lamblia* (Abdul-Wahid e colaboradores, 2007) e *Cryptosporidium parvum* (Sagodira e colaboradores, 1999), entre outros; os vírus: da hepatite B (Gu e colaboradores, 2007) e da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)

(Huang e colaboradores, 2007); a micobactéria *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) (Lowrie e colaboradores, 1999; Paula e colaboradores, 2007) e também contra as células tumorais (Luo e colaboradores, 2005; Hung e colaboradores, 2007 e Kim e colaboradores, 2008).

As vacinas de DNA são capazes de modular tanto a imunidade humoral como a celular, com estimulação dos linfócitos TCD4 e TCD8 citotóxicos. A **figura 1** mostra um padrão de ativação da resposta, gerando memória imunológica permanente no indivíduo que recebe a vacina de DNA. Após a introdução do DNA na célula do indivíduo, ocorre a síntese da proteína e esta é clivada pelo proteossoma, gerando peptídeos. Os peptídeos associam-se às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I) por meio, por exemplo, da sinalização de receptores *toll-like*. Assim, os linfócitos T citotóxicos (CTLs) reconhecem estes peptídeos e se tornam ativados. As proteínas produzidas e liberadas pelas células são fagocitadas pelos macrófagos e clivadas. Os peptídeos gerados também podem ser apresentados via complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) aos linfócitos T *helper* (**Figura 1**).



Copyright© 2004 MOGAM Biotechnology Research Institute. All Rights Reserved.

Figura 1 – Mecanismo de ação das vacinas de DNA. Representação da ampla ativação da resposta imunológica, humoral e celular, após administração da vacina.

2. Doenças Fúngicas e Vacinas de DNA

O desenvolvimento de vacinas contra organismos eucariontes representa um desafio, pois a complexidade antigênica desses organismos dificulta a seleção de componentes imunogênicos com potencial protetor. Nos últimos anos, com o aumento da ocorrência das doenças fúngicas associadas a enfermidades

imunossupressoras (Chakrabarti, 2005), grandes esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de imunógenos para a prevenção e tratamento dessas infecções.

As modalidades terapêuticas disponíveis atualmente para doenças fúngicas visam à eliminação dos fungos no organismo. Em muitos casos, devido a mecanismos de persistência do fungo no organismo do hospedeiro ou por efeitos tóxicos causados pelos fármacos, não ocorre uma erradicação total do fungo (Shikanai-Yasuda e colaboradores, 2006).

A anfotericina B, indicada nos casos mais graves de micoses sistêmicas, é um antibiótico poliênico com amplo espectro antifúngico, atividade fungicida e raramente desenvolve resistência. Porém, o seu uso se torna restrito devido aos sérios efeitos tóxicos observados (Atkinson e Bennett, 1978; Fukui e colaboradores, 2003).

A busca por novas alternativas de tratamento faz-se necessária diante das dificuldades e insucessos das terapias fúngicas atuais e vários estudos vêm sendo conduzidos neste sentido. Antígenos ou $\mu\mu\nu$ γ veos e seus possíveis mecanismos de proteção foram e estão sendo estudados em diversos fungos, como exemplificado na **tabela 1**.

Tabela 1 –Imunógenos e seus possíveis mecanismos de proteção estudados em fungos

Fungo	Imunógeno	Possível mecanismo de proteção	Referência
Cândida spp	HSP90	Anticorpos	Matthews e col, 1991 Matthews e col, 1995
Coccidioides spp	Antígeno rico em prolina	Dependente de IFN- γ	Abuodeh e col, 1999
	Urease	ao conhecido	Li e col, 2001
<i>Histoplasma capsulatum</i>	HSP60	Indução de IFN- γ e IL-1 β Dependente de células T CD4	Deepe e Gibbons, 2002
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Gp43	Dependente de Células T	Pinto e col, 2000

Dados retirados do artigo Cutler e col, 2007

3. Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM), micose profunda, caracterizada por reação inflamatória supurativa, de evolução crônica, é uma doença própria das regiões tropicais e subtropicais da América Latina (Restrepo, 1985)

que tem grande frequência principalmente no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina. O agente etiológico desta doença foi identificado pela primeira vez por Lutz, em 1908. Os estudos de Splendore em 1912, Almeida em 1930 e outros permitiram a classificação do fungo, que foi denominado *Paracoccidioides brasiliensis* (Gotz, 1954)

A infecção no homem ocorre pela entrada no corpo humano (37°C) de esporos ou fragmentos de micélio (McEween e colaboradores, 1987), por via aerógena e, excepcionalmente, por fissuras na pele, onde ele se diferencia para a forma de levedura, etapa esta fundamental para o desenvolvimento da PCM.

A PCM é caracterizada por manifestações clínicas de doença granulomatosa crônica, supressão da imunidade celular e altos títulos de anticorpos. Acredita-se que a infecção primária ocorra principalmente através da inalação de conídios ou fragmentos de micélio e em seguida, ocorre a conversão para a forma parasita de levedura, processo este fundamental para o estabelecimento da infecção (Franco, 1987, McEween e colaboradores, 1987). O fungo estabelece-se inicialmente nos pulmões e pode disseminar-se através da corrente sanguínea e/ou sistema linfático para linfonodos, superfícies cutâneas e outros órgãos (Brummer e colaboradores, 1993). A infecção pode dar-se ainda por trauma na mucosa oral, anal ou cutânea (Domer e colaboradores, 1982).

Uma vez estabelecida a infecção no homem pelo *P. brasiliensis*, as lesões pulmonares podem permanecer inaparentes ou levar ao desenvolvimento da doença propriamente dita, com ou sem disseminação para outros órgãos ou sistemas. Nos indivíduos que apresentam a doença, as manifestações clínicas são diversas, sendo caracterizadas principalmente por granulomas crônicos com alta frequência de lesões pulmonares e mucocutâneas (Franco, 1987; Franco e colaboradores, 1993).

A PCM possui duas formas clínicas: a aguda e a crônica. A forma aguda acontece principalmente em jovens de ambos os sexos e caracteriza-se por uma evolução rápida e severa. Envolve principalmente o sistema retículo-endotelial, minando as condições gerais de saúde do paciente. Na forma crônica, a evolução dá-se de modo lento, podendo apresentar-se nas formas polar, benigna, localizada, severa e disseminada; além de várias formas intermediárias. Os pacientes, geralmente adultos do sexo masculino, apresentam lesões granulomatosas envolvendo os tratos respiratórios e mucocutâneos, sendo consideradas uma reativação de focos latentes do fungo (Franco, 1987; Franco e colaboradores, 1993). A forma crônica é a forma clínica mais comum da PCM, na qual a diversidade das manifestações parece não só depender das condições imunológicas do hospedeiro, mas também da variabilidade de virulência dos diferentes isolados do fungo.

A natureza da imunidade protetora contra o *P. brasiliensis* é motivo de extensa pesquisa. Investigações experimentais (Castaneda e colaboradores, 1988; Singer-Vermes e colaboradores, 1993, Souto e colaboradores, 2000; Chiarella e colaboradores, 2007) e clínicas (Mota e colaboradores, 1988; Camargo e colaboradores, 1994) mostram a relevância das respostas imunológicas humoral e/ou celular na patogênese e evolução da PCM, além de vários estudos que também demonstram a importância da participação dos mecanismos naturais de defesa do

hospedeiro (Calich e colaboradores, 1979; Jimenez e Murphy, 1984; Boscardin e colaboradores, 1985; Brummer e colaboradores, 1989).

A resposta imunológica celular do hospedeiro frente a este organismo invasor culmina com uma reação inflamatória progressiva e granulomatosa, considerada uma resposta tecidual especializada e eficiente contra certos parasitas (Adams, 1976) e substrato morfológico de inúmeras infecções fúngicas (Gómez e colaboradores 1988; Huffnagle e colaboradores, 1991). O desenvolvimento de múltiplos granulomas, após infecção sistêmica com patógenos intracelulares, tais como *Mycobacterium bovis* e *Listeria monocitogenes*, constitui um clássico modelo de imunidade celular (Mackanness, 1962; Blanden e colaboradores, 1969).

O granuloma paracoccidíóico consiste numa coleção de células do sistema mononuclear fagocitário, circundando os parasitas degenerados, que tendem a crescer e se transformar em células epitelióides e células gigantes multinucleadas, caracterizando um granuloma do tipo epitelióide. Além disso, podem ser observados em torno destas células infiltrados de linfócitos T, tendo a maioria CD4⁺ com poucas células CD8⁺, de fibroblastos, de plasmócitos secretores de IgG, de mastócitos e de eosinófilos (Adams, 1976 e De Brito e Franco, 1994). Apesar de os mecanismos precisos de formação e de manutenção do granuloma não estarem bem elucidados, as citocinas têm sido implicadas como um importante determinante na sua formação e manutenção, já que o diferente padrão de citocinas expressas por linfócitos T infiltrados e, em particular, a alteração do balanço Th1/Th2 influencia a evolução da inflamação granulomatosa. Durante a formação de um granuloma típico de hipersensibilidade, um perfil de citocinas Th1 predomina. O perfil Th2 está associado a uma reação granulomatosa prejudicada com resistência reduzida para patógenos intracelulares (Kunkel e colaboradores, 1996). A formação e a manutenção do granuloma na PCM experimental dependem da presença de Interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Cano e colaboradores (1998) demonstraram que animais tratados com anticorpos monoclonais anti - IFN- γ , independente da linhagem utilizada (resistente ou susceptível), tinham o parênquima pulmonar quase totalmente substituído por granulomas extensos e frouxos, contendo inúmeras células leveduriformes. Souto e colaboradores (2000), utilizando camundongos deficientes geneticamente para IFN- γ , observaram um infiltrado inflamatório composto de poucos neutrófilos, mononucleares e células epitelióides, formando granulomas incipientes, com grande número de leveduras do fungo e disseminação; enquanto animais com o gene do receptor p55 de TNF- α nocauteado apresentavam uma inflamação difusa sem formação de granuloma típico com muitas células leveduriformes. A importância do TNF- α no granuloma foi demonstrada também para estudos em humanos, pois, utilizando células mononucleadas do sangue periférico de pacientes de PCM, demonstrou-se que o aumento da formação *in vitro* de granuloma, em resposta a diferentes frações antigênicas de *P. brasiliensis*, estava dependendo da via que induz uma resposta imune do tipo Th1 ou Th2.

A IL-4 é um importante fator regulador da resposta imunológica inflamatória, fazendo parte de um conjunto de moléculas que apresentam a capacidade de desativar macrófagos, através de mecanismos que conduzem à inibição da produção de TNF- α , TNF- β , IL-1 β , IL-6, IFN- γ e IL-12 (D'Andrea e colaboradores, 1995; Hart e colaboradores 1995). Células de linfonodos de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*, após uma semana, desenvolveram um aumento substancial na quantidade de IL-4 no sobrenadante de cultura ao serem estimulados com leveduras mortas de *P. brasiliensis*, o qual corresponde ao aumento dos níveis séricos de IgE (Hostetler e colaboradores, 1993). Concomitantemente à elevação dos níveis de mRNA para IL-4 nos camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* 18, obteve-se uma elevação do mRNA para interleucina 10 (IL-10), que é uma citocina com amplas propriedades sobre o sistema imune (Moore e colaboradores, 1993). A IL-10 constitui o principal fator de desativação de monócitos e macrófagos ativadas, exercendo seus efeitos inibitórios sobre a produção das citocinas pró-inflamatória, fatores de crescimento hematopoiético e também através da diminuição da expressão de moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade principal (De Waal Malefyt e colaboradores, 1991; Thomassen e colaboradores, 1996).

Portanto, as diferenças no perfil de citocinas podem ter um impacto no tipo de granuloma formado, suas intensidade e extensão de necrose central. Além disso, a resistência à PCM está relacionada a um padrão de resposta imunológica do tipo Th1 - padrão protetor para o hospedeiro. O desenvolvimento da doença e sua susceptibilidade estão relacionados a um padrão de resposta imunológica do tipo Th2 (Kashino e colaboradores, 2000).

O padrão de citocinas produzido pelos linfócitos T também é influenciado pelos antígenos do patógeno que são apresentados a essas células. A glicoproteína Gp43 foi descrita como sendo o antígeno imunodominante mais específico do fungo *P. brasiliensis*. Esta molécula é reconhecida pelo soro de quase 100% de pacientes com a forma crônica da PCM (Moura Campos e colaboradores, 1995). A seqüência completa do gene que codifica para a Gp43 foi caracterizada por Cisalpino e colaboradores (1996). A proteína Gp43 está associada à invasão e à disseminação do fungo *P. brasiliensis* a órgãos e tecidos (Vicentini e colaboradores, 1994).

Taborda e colaboradores (1998) identificaram epítomos da Gp43 capazes de gerar diferentes respostas, sendo o peptídeo P10 capaz de provocar uma resposta imunológica celular de padrão Th1. Este epítipo de 15 resíduos de aminoácidos conferiu proteção contra PCM em animais BALB/c infectados, no entanto, Pinto e colaboradores (2000) após imunizarem animais com o gene da Gp43 mostraram uma redução da carga fúngica pulmonar; porém, os animais apresentaram um padrão de resposta imunológica celular misto, Th1/Th2 (Pinto e colaboradores, 2000). Mais recentemente, a associação entre a imunização com o peptídeo P10 e a quimioterapia levou a melhoria no tratamento e prevenção das recaídas (Marques e colaboradores, 2006). Além da vacina utilizando o gene da Gp43, outros estudos foram conduzidos com animais imunizados por meio das

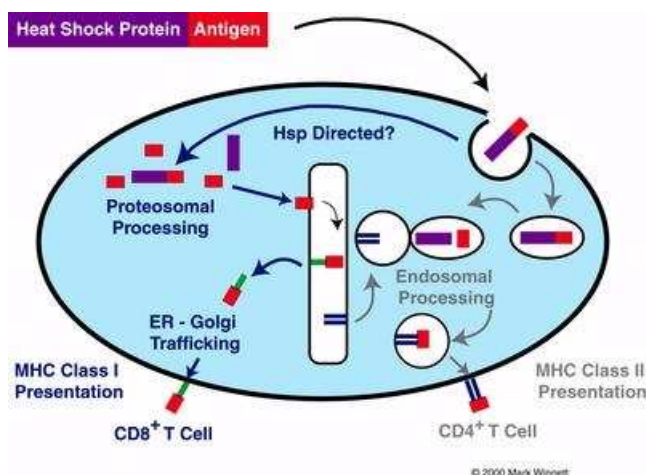
frações F0 e FII purificadas do fungo *P. brasiliensis* e os resultados não foram consistentes com um padrão de resposta imunológica protetora para o hospedeiro, ou seja, padrão Th1 (Diniz e colaboradores, 2004).

4. HSPs e Vacinas de DNA

Em 1962, os genes que codificam as HSPs foram identificados ao acaso, quando pesquisadores notaram que altas temperaturas induziam a expressão de genes de um padrão incomum em cromossomos politêmicos de glândulas salivares de *Drosophila melanogaster* (Ritossa, 1962). Porém, apenas em 1974 o produto destes genes foi chamado de *Heat Shock Proteins* – HSPs. (Tissieres e colaboradores, 1974). Sob condições fisiológicas, as HSPs constituem de 5-10% do conteúdo protéico de uma célula normal, mas podem aumentar sua concentração intracelular duas ou três vezes sob condições adversas (Lindquist, 1998). Nestes casos, a síntese de HSPs é aumentada para proteger as células de possíveis danos durante períodos de estresse causados por infecções, inflamações ou eventos similares. As HSPs são moléculas evolutivamente conservadas, expressas em eucariotos, procariotos e plantas, e são encontradas em vários compartimentos celulares como citosol, núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria e cloroplastos, entre outros (Lindquist, 1998). As HSPs exercem funções vitais na homeostase celular, atuando como chaperonas, participando do dobramento, desdobramento e montagem de proteínas, prevenindo desnaturação e agregação protéica, além de exercerem atividade ATPase e transporte de peptídeos (Lindquist, 1986).

Estudos sobre as funções imunológicas das HSPs começaram a surgir na década de 80, quando foi observado que preparações homogêneas de HSPs isoladas de células cancerígenas eram capazes de induzir imunidade contra câncer, enquanto que preparações correspondentes de tecidos normais, não o fizeram (Srivastava e colaboradores, 1998). Posteriormente, foi descoberto que este fenômeno também era observado nas células infectadas com agentes patogênicos e eram decorrentes da função chaperonina das HSPs, que formam complexos com peptídeos tumorais ou com peptídeos de patógenos intracelulares (complexo HSP-peptídeo) como o *M. tuberculosis* e HIV (SenGupta e colaboradores, 2004). Embora os complexos HSPs-peptídeos também sejam formados nas células normais, eles são reconhecidos como próprios pelo sistema imunológico e não induzem resposta imune contra os mesmos (Multhoff, 2006).

Assim, as HSPs podem se associar a peptídeos endógenos ou de algum patógeno. Esta associação melhora a eficiência do mecanismo de apresentação antigênica via MHC I. Os complexos proteína-HSP podem ser fagocitados e serem apresentados também via MHC II. Além dessas associações, o complexo proteína-HSP liberado pela célula também pode se ligar a receptores, como o CD91, induzindo o novo processo de ativação das células (**Figura 2**).



Max W. 2000

Figura 2 – Mecanismo de ação dos complexos HSP-antígenos. As HSPs se associam aos peptídeos endógenos ou de algum patógeno (externo).

Portanto, as HSPs são proteínas imunogênicas capazes de ativar fortemente uma resposta imunológica humoral e uma resposta celular (Zügel e Kaufmann, 1999; Fałkowska-Podstawka e Wernicki, 2003). Em modelos experimentais, as vacinas utilizando as HSPs foram testadas para diversas doenças, incluindo a hepatite B (Gu e colaboradores, 2007) a AIDS (Brenner e colaboradores, 2001; SenGupta e colaboradores, 2004) e o câncer (Peibin e colaboradores, 2002). Testes clínicos já estão sendo conduzidos (SenGupta e colaboradores, 2004; Roman e colaboradores, 2007). Recentemente, Roman e colaboradores (2007) mostraram que a vacina com a HSP-7 induziu regressão nas lesões em pacientes com elevado nível de neoplasia intraepitelial.

Vacinas utilizando as HSPs já estão sendo testadas contra as doenças fúngicas como os exemplos a seguir: a HSP60 recombinante (rHSP60) que conferiu proteção em camundongos contra a infecção por *H.capsulatum* (Deepe e colaboradores, 1996; Deepe e Gibbons, 2002) e a rHSP90 para *Candida albicans* (Matthews e colaboradores, 1991; Matthews e colaboradores, 1995). Recentemente, Cutler e colaboradores (2007) revisaram os novos avanços no combate de doenças fúngicas focando a utilização de vacinas.

5. Vacina de DNA –*hsp65* de *Mycobacterium leprae*

A vacina DNA-*hsp65* é composta por um plasmídeo de DNA carreando um gene que codifica a HSP65 de micobactéria (*Mycobacterium leprae*). Os primeiros resultados dessa vacina, publicados na revista *Nature*, em 1999, mostraram que o plasmídeo DNA-*hsp65* foi capaz de curar casos crônicos de tuberculose e casos de

tuberculose latente (Lowrie e colaboradores, 1999). A reativação da doença também foi impedida em animais de laboratório imunossuprimidos e, quando associada à quimioterapia, a vacina DNA-*hsp65* reduziu significativamente o tempo de tratamento dos animais (Silva e colaboradores, 2005). Quando usada, tanto para prevenir como para tratar a tuberculose, a vacina DNA-*hsp65* induziu uma mudança no padrão de resposta imunológica. Ela promove a ativação de células APCs (macrófagos e CDs), linfócitos T CD4 e T CD8 de memória, além de linfócitos T gama /delta e células NK; e a secreção de mediadores imunológicos (interleucinas e quimiocinas) de padrão Th1 (Bonato e colaboradores, 1998). A ativação dessas células e a liberação desses mediadores criam um microambiente favorável à erradicação do bacilo. É importante ressaltar que células dendríticas ou linfócitos T CD8+, ambos obtidos de animais imunizados com o DNA-*hsp65* e transferidos para animais não vacinados, induzem, isoladamente, proteção significativa contra a infecção por *M. tuberculosis* (Célio L Silva, comunicação pessoal). Os estudos com a vacina DNA-*hsp65* foram estendidos para outras doenças e os resultados foram reproduzidos: artrite reumatóide (Santos-Junior e colaboradores, 2005), aterosclerose (Fonseca e colaboradores, 2007) e leishmaniose (Coelho e colaboradores, 2006). Testes clínicos utilizando a vacina de DNA contendo o gene *hsp65* de *M. leprae* já estão em andamento para o tratamento de tuberculose e câncer (Célio L. Silva, comunicação pessoal).

Os resultados obtidos com a vacina DNA-*hsp65* demonstram também que a via de administração (intramuscular, subcutânea, intranasal, intratraqueal) e a formulação (DNA em salina, *gene gun*, lipossoma, microesferas, sistema *prime-boost*) por intermédio das quais o plasmídeo DNA-*hsp65* é administrado exercem influência significativa no padrão e duração da resposta imunológica desencadeada (Lima e colaboradores, 2003).

A vacina DNA-*hsp65* ainda não foi testada em doenças fúngicas. Diante dos dados levantados e já publicados na literatura com esta vacina e das dificuldades dos tratamentos convencionais para infecções fúngicas, este trabalho foi idealizado e desenvolvido.

II. Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi verificar se a vacina DNA-*hsp65* é capaz de modular a resposta imunológica dos camundongos infectados experimentalmente com o fungo *P. brasiliensis*.

Objetivos Específicos

1. Verificar se a aplicação da vacina DNA-*hsp65* antes da infecção experimental com o *P. brasiliensis* interfere na evolução da doença e na ativação do sistema imunológico.
2. Verificar se a aplicação da vacina DNA-*hsp65* depois da infecção experimental com o *P. brasiliensis* interfere na evolução da doença e na ativação do sistema imunológico.

III. Materiais E Métodos

1. Preparação da vacina DNA-*hsp65*

1.1 Plasmídio DNA-*hsp65*

O plasmídio DNA-*hsp65*, composto pelo gene *hsp65* de *M. leprae* inserido no vetor de expressão pVAX1 (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), foi fornecido pelo Prof. Dr. Célio Lopes Silva (USP- Ribeirão Preto - Brasil). O vetor pVAX1 possui o gene de resistência à kanamicina e, por isso, é adequado para estudos de vacinas de DNA e liberado para ensaios clínicos (**figura 3**).

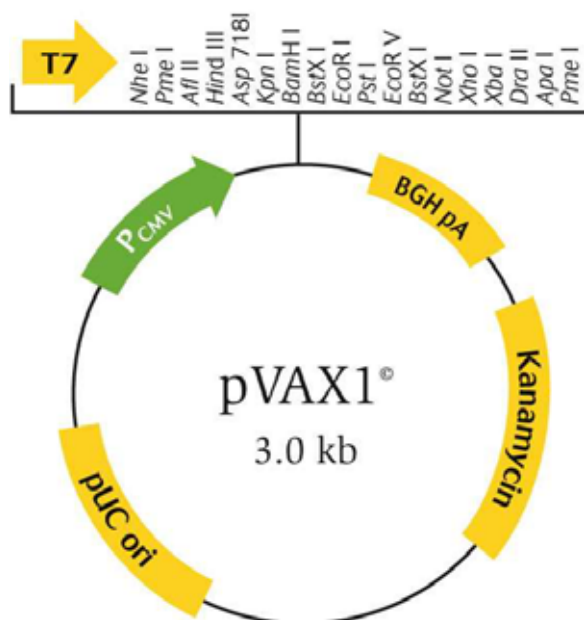


Figura 3 – Mapa do vetor de expressão pVAX1.

1.2 Amplificação e purificação plasmidial

O clone pVAX1- *hsp65* foi transformado utilizando - se as células competentes da linhagem DH5 α de *Escherichia coli*. A transformação foi realizada por choque térmico. O vetor sem o inserto (pVAX1) também foi transformado para ser usado como controle negativo. Após a transformação, as colônias foram selecionadas e crescidas em 250 mL de meio líquido *Luria Broth* (LB, GIBCO-BRL) contendo kanamicina (100 μ g / mL), durante 12h, a 37°C, sob agitação. A purificação plasmidial foi realizada segundo o protocolo de maxipreparação livre de endotoxinas (QIAGEN AG, Basel, Switzerland). Em seguida, as amostras foram submetidas à quantificação de lipopolissacarídeos (LPS) de acordo com o *kit* comercial QCL-1000® Chromogenic LAL Endpoint Assay (Cambrex Company, Walkersville, MD, USA). A quantificação de

endotoxinas nas amostras preparadas foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Célio Lopes Silva (USP- Ribeirão Preto - Brasil) e todas as amostras que obtiveram valores menores que 0,1 EU / μg foram utilizadas em nossos ensaios.

2. Preparação e administração do inóculo de *P. brasiliensis*.

2.1 Preparo do inóculo

Foram utilizadas leveduras do isolado virulento do *P. brasiliensis* 18 obtidas da coleção do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB). O fungo foi cultivado em meio líquido YPD (1% de extrato de levedo, 2% de peptona, 2% de glicose) durante cinco dias, a 36°C, sob 220 rotações por minuto (rpm). As leveduras foram separadas dos grumos por agitação mecânica, lavadas com tampão fosfato salino estéril 0,1 M (PBS pH 7,2) e ressuspensas para se obter uma concentração de 1×10^7 células viáveis /mL em PBS estéril. A viabilidade das células foi determinada usando *Janus Green B vital dye* (Merck, Darmstadt, Germany) (Berliner e Reca, 1966).

2.2 Via de administração e dose de infecção

Os animais foram infectados como o inóculo de *P. brasiliensis* pelo plexo venoso retro-orbital. Cada animal foi inoculado com 100 μL (10^6 células) da suspensão do fungo descrita acima.

3. Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos BALB/c machos, com aproximadamente 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-Ribeirão Preto/São Paulo e mantidos em condições apropriadas, com fornecimento de água e ração *ad libitum*, no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília/DF.

4. Grupos e ensaios experimentais

Os grupos experimentais para os ensaios de imunização ou tratamento foram os descritos a seguir:

- I. 10 animais imunizados ou tratados com o plasmídeo pVAX1-*hsp65* e infectados com *P. brasiliensis*, designados **DNA - *hsp65***;
- II. 10 animais imunizados ou tratados apenas com o vetor vazio (pVAX1), sem o inserto, e infectados com *P. brasiliensis*, designados **pVAX1**;
- III. 10 animais imunizados ou tratados apenas com o veículo da vacina (solução de sacarose 0,9%) e infectados com *P. brasiliensis* designados **INFECTADOS**;
- IV. 10 animais normais que não receberam nenhum tipo de imunização, tratamento e infecção, designados **NORMAIS**.

4.1 Ensaio de Imunização

Os camundongos receberam três doses de 100 µg de DNA plasmidial, contendo ou não o gene que codifica a proteína HSP65 do *M. leprae*, por via intramuscular, nas duas coxas traseiras (50 µg de DNA por coxa), em intervalos de 15 dias entre cada aplicação. Após 15 dias da última aplicação, os camundongos foram infectados com leveduras do fungo *P. brasiliensis* (10^6 células) por via endovenosa. Após o período de 30 ou 60 dias (30d ou 60d), os animais foram sacrificados (ver eutanásia item 5), a evolução da doença e o padrão de resposta imunológica gerada foram analisados. A **figura 4** abaixo esquematiza os protocolos experimentais de imunização com a vacina DNA-*hsp65* 30 dias ou 60 dias (30d ou 60d) após a infecção.

Alguns animais foram utilizados para a imunização com a vacina DNA-*hsp65* (3 doses); porém, não foram infectados com *P. brasiliensis* após 15 dias da última dose (animais apenas vacinados e não infectados).

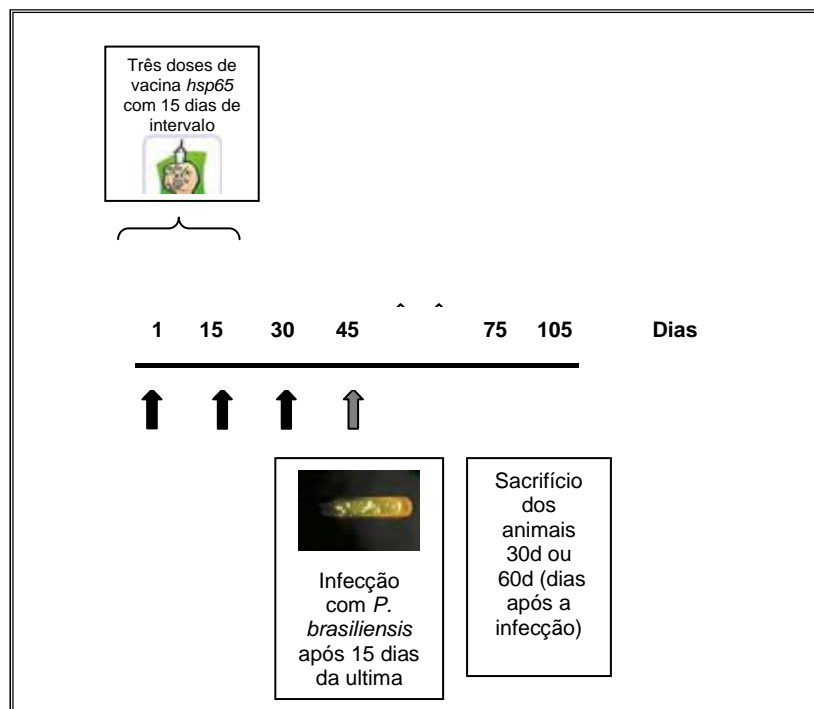


Figura 4 – Protocolo experimental dos ensaios de imunização com vacina DNA-*hsp65* 30 ou 60 dias após a infecção (30 d e 60d) com *P. brasiliensis*. Camundongos BALB/c receberam 3 doses de 100µg cada de vacina de DNA- *hsp65* com o intervalo de 15 dias entre elas. Após 15 dias, os animais foram infectados com *P. brasiliensis* (10^6 células). Decorridos 30d ou 60d, os animais foram sacrificados, a evolução da doença e o padrão de resposta imunológica gerada foram analisados.

4.2 Ensaios de Tratamento

Inicialmente, camundongos BALB/c foram infectados com leveduras do fungo *P. brasiliensis* (10^6 células). Após 60 dias de infecção (60d), os camundongos receberam quatro doses de 100 µg DNA plasmidial, contendo ou não o gene que codifica a proteína HSP65 do *M. leprae*, por via intramuscular, nas duas coxas traseiras (50 µg de DNA por coxa), em intervalos de 15 dias entre cada aplicação. Após 15 dias da última aplicação, os camundongos foram sacrificados, e analisados a evolução da doença e o padrão de resposta imunológica gerada. A **figura 5** abaixo esquematiza o protocolo experimental de tratamento com a vacina DNA-*hsp65*.

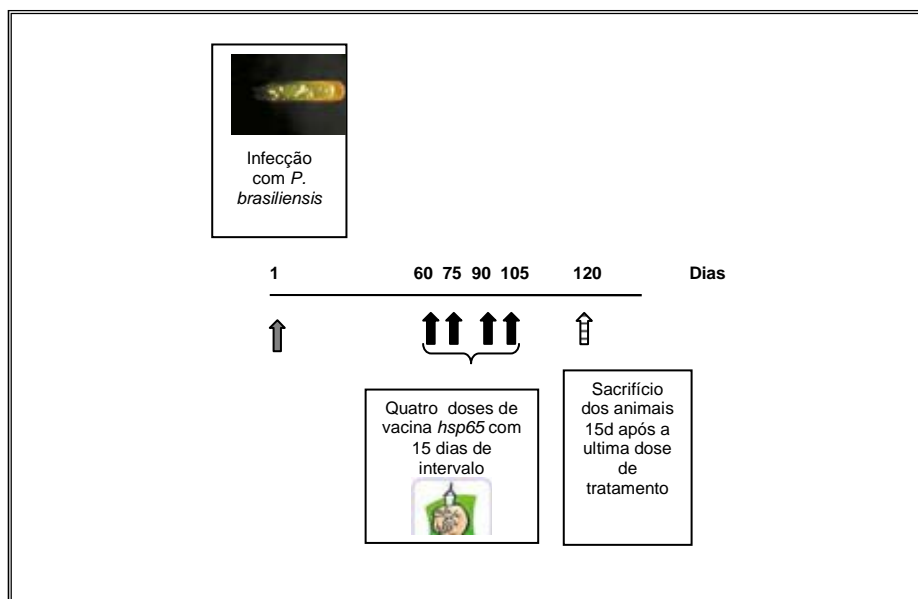


Figura 5 - Protocolo experimental dos ensaios de tratamento com a vacina DNA-*hsp65* após infecção com *P. brasiliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados com *P. brasiliensis* (10^6 células) e, após 60 dias, submetidos ao tratamento com a vacina de DNA (pVAX1- *hsp65*). Quatro doses de vacina *hsp65*, cada uma contendo 100 μ g de DNA plasmidial, foram administradas com intervalo de 15 dias entre elas. Após 15 dias da última dose, os animais foram sacrificados e analisados a evolução da doença e o padrão de resposta imunológica gerada.

5. Eutanásia dos animais, retirada e armazenamento dos órgãos.

Decorrido o período previsto e descrito anteriormente de cada ensaio experimental (imunização 30d, imunização 60d e tratamento 60d), os animais foram inicialmente anestesiados com éter e em seguida sacrificados por deslocamento cervical. Os procedimentos realizados estão de acordo com o Comitê Brasileiro de Ética Animais (COBEA) e foram analisados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (anexo 1).

Imediatamente após o deslocamento cervical, foram realizados os seguintes procedimentos:

a) coleta sanguínea em tubos plástico de 1,5 mL (Eppendorf). As amostras sanguíneas foram deixadas em repouso por 12 h. Em seguida, foram centrifugadas a 5000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. O soro gerado foi separado em outro tubo plástico de 1,5 mL e, em seguida, armazenado a -20°C para futuros ensaios.

b) uma ampla incisão longitudinal na parede abdominal em ambiente estéril (fluxo laminar) e, em seguida, retirada de órgãos (pulmão e baço) para futuros ensaios.

6. Análise da evolução da doença

A análise da evolução da doença foi realizada pela coleta de amostras de pulmão para análise histopatológica e recuperação/quantificação fúngica tecidual (pulmonar).

Parte dos fragmentos dos pulmões retirados foi fixada em formol (10%). Após fixação, por período máximo de 8 horas, os fragmentos foram mantidos em álcool 70% e incluídos em parafina. Cortes de 5 mm de espessura foram corados por: hematoxilina-eosina (HE), para a visualização dos fungos e dos granulomas; *masson trichrome*, para a visualização da deposição de colágeno no tecido; e prata, para a observação dos fungos no tecido. Todos os cortes foram examinados em microscópio óptico.

Parte dos fragmentos dos pulmões retirados foi pesada e divulsionada em 1 mL de PBS estéril. Cem microlitros (100 μ L) deste macerado foram semeados em placas de vidro contendo meio ágar BHI (Infusão cérebro / coração) enriquecido com 4 % (v/v) de soro de cavalo, 5 % (v/v) de filtrado de cultura de Pb192 (Singer-Vermees e colaboradores, 1992) cultivado por sete dias e 40 mg/L de gentamicina (Gentamycin Sulfate, Schering – Plough). Em seguida, foram mantidas incubadas, a 36 °C, por até 21 dias (Castaneda e colaboradores, 1988). Foram contadas as unidades formadoras de colônias em todas as placas e os resultados foram expressos em UFC/g de tecido pulmonar \pm desvio padrão da média (SEM).

7. Análise da resposta imunológica

Após o sacrifício dos animais, a análise da resposta imunológica foi realizada por meio da coleta de amostras para a avaliação da capacidade linfoproliferativa, produção e quantificação de citocinas e anticorpos e dosagem de óxido nítrico.

7.1 Ensaio de proliferação de esplenócitos

Após o sacrifício, células do baço foram utilizadas em cultura para avaliar a proliferação celular. As células foram ressuspensas para uma concentração de 5×10^6 células/mL. As células foram colocadas em placas de 96 orifícios de fundo chato, em volume de 100 μ L das suspensões celulares, em triplicata. Às células foram adicionados 100 μ L de meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA) contendo o mitógeno inespecífico Con-A (Concanavalina A). As células foram incubadas por 60 horas, a 37°C, com 5% de CO₂, e, 12 horas antes do término da incubação, 1 μ Ci de timidina tritiada [³H] TdR (1 mCi/mL) foi adicionado às culturas. Após este período, as células foram coletadas e a incorporação da timidina tritiada foi determinada pela radiação liberada, medida em contador de cintilação líquida (Beckman Instruments). Os resultados foram expressos em contagens de pulsos por minuto (CPM) por 5×10^5 células \pm SEM.

7.2 Dosagem de citocinas e anticorpos (IgG1 e IgG2a) por ELISA

Após o sacrifício dos animais, as citocinas produzidas pelos macrófagos e neutrófilos, ambos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, foram dosadas pelo método imunoenzimático ELISA. Foram utilizados kits comerciais padronizados para cada grupo de citocinas (BD Biosciences San Diego CA). As citocinas dosadas foram: a interleucina 4 (IL-4), a interleucina 10 (IL-10), a interleucina 12 (IL-12), o interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O nível absoluto de citocina presente no sobrenadante das preparações obtidas a partir de culturas celulares de baço foi calculado com base em uma curva padrão fornecida com o *kit* comercial.

As amostras de soro de todos os grupos experimentais foram utilizadas para a dosagem dos isótipos IgG1 e IgG2a. Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Célio Lopes Silva (USP- Ribeirão Preto - Brasil). Foram utilizadas placas de ELISA de 96 orifícios (Nunc) sensibilizadas com 100 μ L de proteína recombinante HSP65 (rHSP65 - 250 ng / 100 μ L / orifício), por 12 h, a 4°C. Após a primeira incubação, os orifícios foram bloqueados com tampão fosfato acrescido de caseína a 2%, por 2h, a 37 °C. Posteriormente, os orifícios foram incubados com as amostras dos soros dos animais diluídas 1:100, por 2 h, a 37 °C. Após a incubação, a placa foi lavada com tampão de lavagem (Tampão Fosfato com 0,05% de Tween 20) e incubada com anticorpos específicos, com peroxidase marcada, de camundongo, para os isótipos IgG1 ou IgG2a (SIGMA), diluídos 1:5000, durante 2h, a 37 °C. As placas foram lavadas sete vezes com o tampão de lavagem e incubadas com H₂O₂ e o-fenilenediamina para o desenvolvimento da reação. Esta foi interrompida com 20 μ L de H₂SO₄ 2N e as leituras foram realizadas em filtro de 492 nm em uma leitora de placas de ELISA (BIORAD, modelo 2550, CA, USA).

7.3 Dosagem da concentração de NO₃ e NO₂

O Óxido Nítrico (NO) decompõe-se espontaneamente em nitritos (NO₂⁻) e nitratos (NO₃⁻) no meio de cultura e a produção de (NO₂⁻) pelos macrófagos pode ser dosada por ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess (Green e colaboradores, 1981). Para esta dosagem foi adicionado aos sobrenadantes o mesmo volume do reagente de *Griess*, que continha NEED 0,1% (N- (1-Naphthyl) ethyl-enedinamine – SIGMA Chemical, lote 23H0262, USA) e sulfanilamida 1% (VETEC, lote 020698, Brasil) diluída em ácido fosfórico (H₃PO₄) a 5% (VETEC). As amostras foram lidas em leitor de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – Enzima imunoensaio) com filtro de 450nm. Os resultados foram expressos em μ mol/L de NO₂⁻ por 3 x 10⁶ células após 24h de incubação, comparando-se a DO (Densidade Ótica) do experimento com a DO da curva padrão de NO₂⁻

feita junto com o experimento e que variou de 3,125 a 200,0 μM (Green e colaboradores, 1981). Os resultados foram expressos em μM de $\text{NO}_2^- \pm \text{SEM}$.

A dosagem de NO no soro dos animais foi realizada através de redução enzimática do NO_3^- em NO_2^- pela enzima nitrato redutase. Os soros foram diluídos (1:5 em água destilada) e alíquotas de 50 μL foram incubadas com o mesmo volume do tampão redutase (fosfato de potássio 0,1M pH 7,5 contendo 1mM NADPH, 10 mM FAD e 4U nitrato redutase/mL), por 12 horas, a 37°C. A curva de nitrato foi também incubada com tampão redutase. A concentração do nitrito foi determinada pela reação colorimétrica de Griess. Os resultados foram expressos em μM de $\text{NO}_3^- \pm \text{SEM}$.

8. Western Blot

Os soros de animais imunizados (60d) ou tratados com a vacina DNA-*hsp65* e infectados com *P. brasiliensis* foram utilizados para a realização do *Western Blot*. rHSP65 (10 μg), extrato bruto da parede celular de *P. brasiliensis* 18 (50 μg) e a proteína Gp43 purificada de cultura de *P. brasiliensis* 339 foram separados em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (0.2 μm , SIGMA) segundo protocolo padrão (Towbin e colaboradores, 1979). O marcador de proteína utilizado foi o *Kaleidoscope* (Bio Rad). A rHSP65 foi fornecida pelo Prof. Dr. Célio Lopes Silva (USP- Ribeirão Preto - Brasil) e a Gp43 purificada pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo (USP-SP-Brasil). As membranas foram, em seguida, bloqueadas com PBS acrescido de caseína 2% (PBS/caseína 2%) e incubadas por 30 minutos. Após este período, as membranas foram incubadas por 16 h com os soros dos animais diluídos 100 vezes (1:100). Nas incubações realizadas como controles positivos do experimento, foram utilizados anti- rHSP65 (para a rHSP65) e soro de animal infectado 60 dias com *P. brasiliensis* 18 (para o extrato bruto de *P. brasiliensis* 18 e Gp43 de *P. brasiliensis* 339). Nas incubações realizadas como controle negativo, foi utilizado soro de animais normais, ou seja, não imunizados, não tratados e não infectados com *P. brasiliensis*. Anticorpo específico contra camundongo (IgG anti- camundongo, NOVAGEN), marcado com fosfatase alcalina e diluído 5000 vezes (1:5.000) foi utilizado como o segundo anticorpo do sistema. As membranas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com o segundo anticorpo. Após a lavagem das membranas com PBS, as reações foram reveladas adicionando-se nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (PROMEGA).

9. Reprodutibilidade experimental e Análise estatística

Todos os experimentos foram repetidos três vezes, de forma independente, utilizando diferentes lotes do plasmídeo e de animais. Os resultados apresentados correspondem a um experimento com dados similares estatisticamente aos outros dois experimentos. A análise da variância (ANOVA), seguida do

método *Dunnet* (pós-teste), foi utilizada para determinar as diferenças entre os grupos em cada experimento. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,01$ (*). A análise da variância (ANOVA) e o método de *Dunnet* foram realizados pelo programa estatístico *GraphPad Prism* versão 5.0, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA. Todos os valores estão expressos em média \pm desvio da média (SEM).

IV. Resultados

1. Imunização com a vacina DNA - *hsp65*

1.1 Análise histopatológica e Recuperação/Quantificação fúngica pulmonar

As análises histopatológicas de fragmentos de pulmão obtidos dos animais que receberam 3 doses da solução de sacarose (grupo INFECTADO) ou do vetor vazio (grupo pVAX1), posteriormente infectados com o *P. brasiliensis*, apresentaram o padrão histológico característico desta infecção. Observou-se uma resposta inflamatória progressiva, caracterizada por uma resposta difusa. Após 30 dias de infecção (30d), observou-se uma maior quantidade de células do sistema mononuclear fagocítico, com elementos em diferentes graus de diferenciação morfológica, como células monocitóides, epitelióides e, em menor quantidade, gigantes policarióticas. As lesões apresentaram um padrão difuso e este associou-se ao aumento na presença do fungo nos grupos INFECTADOS e pVAX1.

Após 60 dias de infecção (60d), a resposta inflamatória tornou-se claramente circunscrita, com claro estabelecimento de um padrão granulomatoso. Observou-se o predomínio de células epitelióides, cuja disposição circunscreveu a maioria das estruturas leveduriformes do fungo, que apresentaram um padrão proliferativo com a progressão da infecção (**Figuras 6A e 6C**). Um aspecto confluyente e frouxo desses granulomas determinou o comprometimento de extensas áreas do pulmão com presença de tecido colágeno como que subdividindo e envolvendo as lesões (**Figura 6E**).

Os animais que receberam 3 doses do vetor contendo o gene *hsp65* (grupo DNA-*hsp65*) e, posteriormente, foram infectados com o *P. brasiliensis* apresentaram um padrão de resposta inflamatória diferente daquela previamente descrita (grupo pVAX1) e que corresponde ao curso da infecção de animais infectados. De forma geral, a resposta inflamatória no pulmão dos animais do grupo DNA-*hsp65* apresentou um comprometimento pulmonar de menor intensidade nos dois tempos avaliados (30d e 60d). Após 60 dias de infecção, os granulomas apresentaram-se de forma mais definida, com um padrão mais circunscrito e a confluência dessas lesões, característica marcante a partir deste tempo (60d), não foi observada (**Figura 6B**). Quanto à presença de leveduras do fungo nas lesões, observou-se uma redução nas lesões com 60 de infecção (**Figura 6D**). As áreas do pulmão que apresentaram lesões granulomatosas diminuíram muito e os poucos granulomas observados apresentaram baixa presença de colágeno (**Figura 6F**).

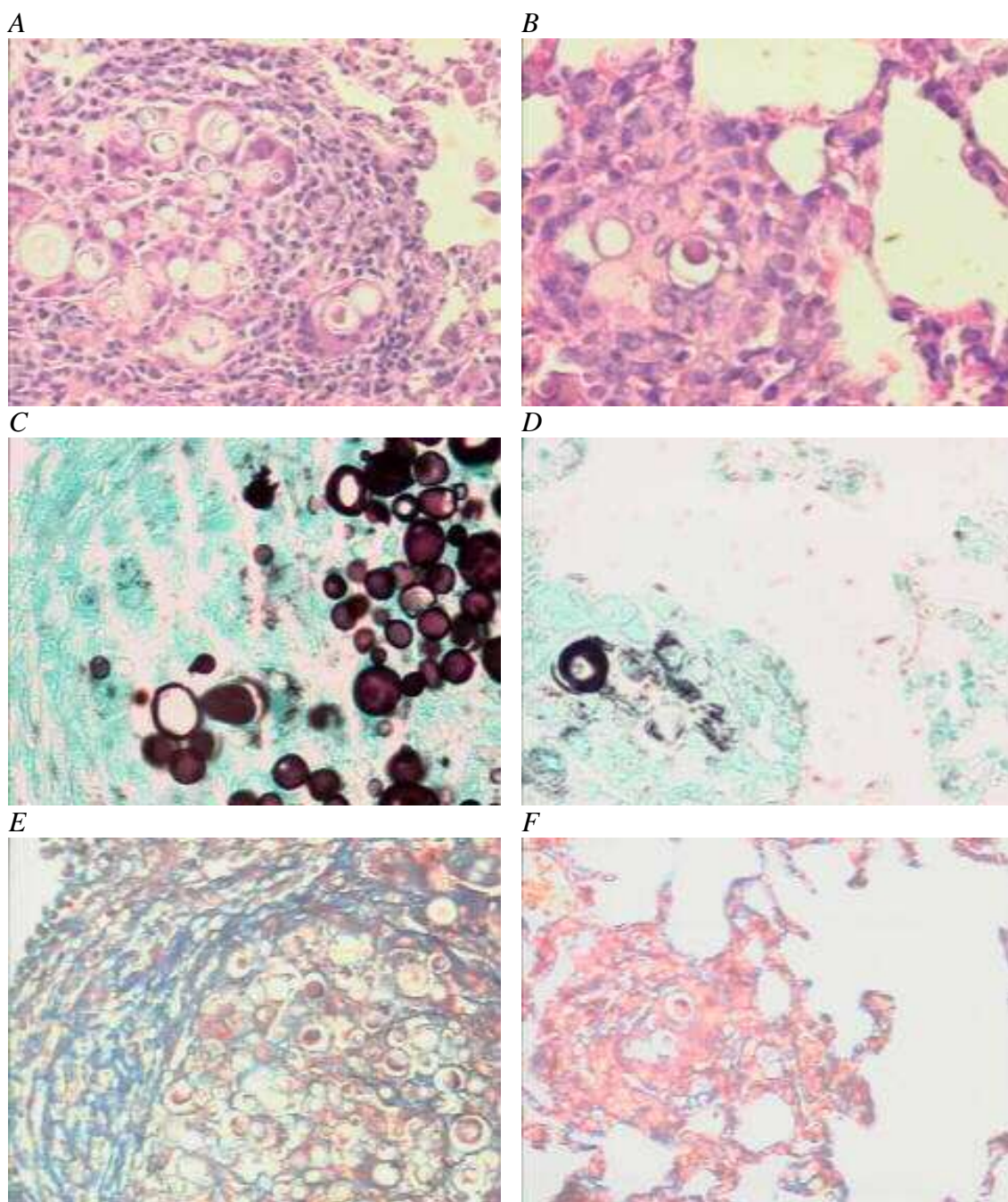


Figura 6 – Cortes histopatológicos de animais dos grupos pVAX1 e pVAX1-*hsp65* com 60 dias de infecção com *P. brasiliensis* (ensaios de imunização). **A** – Coloração HE, animal do grupo pVAX1, aumento 20x. **B** - Coloração HE, animal do grupo DNA-*hsp65*, aumento 40x **C** - Coloração com prata, animal do grupo pVAX1, aumento 40x. **D** - Coloração com prata, animal do grupo DNA-*hsp65*, aumento 40x. **E** - Coloração *masson* (colágeno), animal do grupo pVAX1, aumento 20x. **F** - Coloração *masson* (colágeno), animal do grupo DNA-*hsp65*, aumento 20x.

A evolução da doença nos animais imunizados e infectados com *P. brasiliensis* foi também monitorada pela contagem de UFC nos pulmões (**Figura 7**). A carga fúngica pulmonar aumentou com o passar do tempo nos animais dos grupos INFECTADOS e pVAX1, caracterizando a evolução progressiva e natural da doença. Animais dos grupos INFECTADOS ($59 \pm 0,8$ UFCs g / pulmão) e pVAX1 ($54 \pm 1,76$ UFCs g / pulmão) apresentaram contagem de UFCs similares após 30 dias de infecção (30d). Observou-se um aumento na presença de UFCs após 60 dias de infecção (60d) nos pulmões de animais dos grupos INFECTADOS (66 ± 2 UFCs g / pulmão) e pVAX1 ($65 \pm 1,76$ UFCs g / pulmão). Os animais imunizados por meio da vacina hsp65 (DNA-hsp65) apresentaram redução significativa da carga fúngica pulmonar, em torno de 50%, após 30 dias de infecção ($29 \pm 1,8$ UFCs g / pulmão) e 60 dias de infecção ($33 \pm 0,8$ UFCs g / pulmão) quando comparada à do grupo INFECTADOS (**Figura 7**).

Esses resultados sugerem que a vacina DNA-hsp65 é capaz de estimular a proteção dos animais após a infecção pelo fungo *P. brasiliensis*, reduzindo o comprometimento e a carga fúngica pulmonar, e, portanto, controlando a evolução da doença.

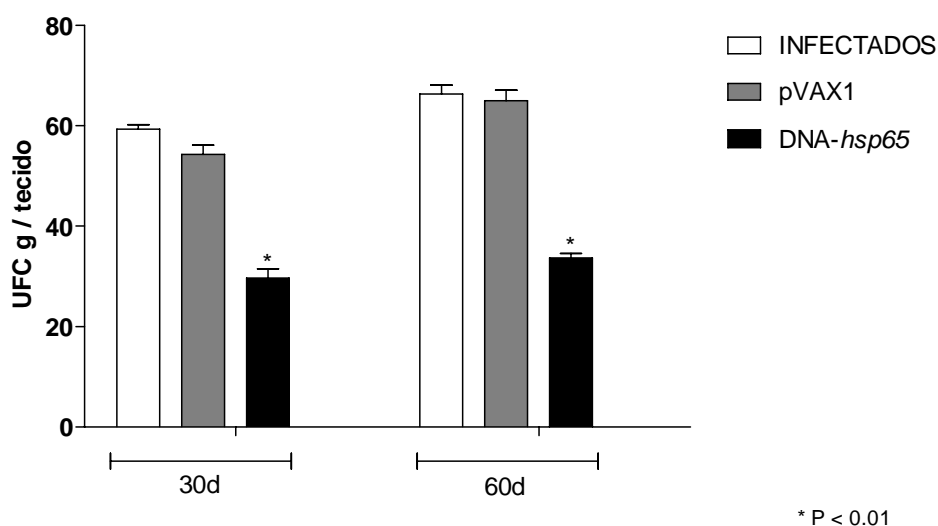


Figura 7 – Quantificação fúngica pulmonar em animais imunizados e infectados com 10^6 células de *P. brasiliensis*. As barras representam as médias de contagens de UFCs g / tecido \pm SEM dos 10 animais pertencentes aos grupos INFECTADOS, pVAX1 e DNA-hsp65, 30 ou 60 dias após a infecção com *P. brasiliensis* (30d ou 60d). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * P < 0.01 em relação a carga fúngica pulmonar dos grupos com os animais do grupo INFECTADOS.

1.2 Padrão de resposta imunológica

1.2.1 Capacidade linfoproliferativa

Vários autores demonstraram que esplenócitos de camundongos infectados com o isolado virulento *P. brasiliensis* 18 têm sua proliferação prejudicada após estímulo com diferentes mitógenos. Após 30 dias de infecção (30d), animais dos grupos INFECTADOS (10.726 ± 836 CPM / células) e pVAX1 (10.250 ± 235 CPM / células) apresentaram redução nas suas capacidades linfoproliferativas quando estimulados com Con-A ao serem comparados aos animais não infectados (NORMAIS, $30.246,3 \pm 939$ CPM / células) (**Figura 8**). Entretanto, a imunização com a vacina DNA-*hsp65* mostrou-se capaz de recuperar a proliferação dos esplenócitos dos animais. Após 30 dias de infecção (30d), os animais do grupo DNA-*hsp65* (28.922 ± 408 CPM / células) apresentaram proliferação celular semelhante aos animais do grupo NORMAIS (Figura 7). Os resultados dos grupos de animais imunizados com a vacina DNA-*hsp65* e infectados 60 dias com *P. brasiliensis*, foram semelhantes aos observados com 30 dias após infecção (**Figura 8**).

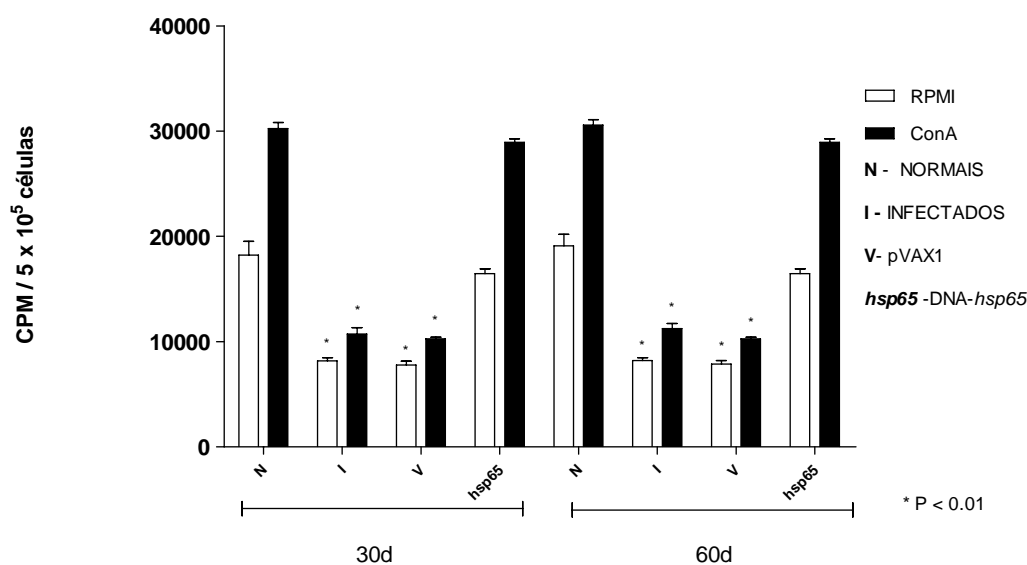


Figura 8 – Resposta proliferativa de cultura de esplenócitos obtidos de camundongos imunizados com a vacina DNA-*hsp65* e infectados com 10^6 células de *P. brasiliensis*. Culturas de esplenócitos foram estimuladas com Con-A ou mantidas em meio de cultura RPMI (não estimuladas). As barras representam as médias em CPM / células \pm SEM dos 10 animais pertencentes aos grupos NORMAIS, INFECTADOS, pVAX1 e DNA-*hsp65*, 30 ou 60 dias após a infecção com *P. brasiliensis* (30d ou 60d). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * $P < 0.01$ em relação à proliferação celular dos grupos com os animais do grupo NORMAIS.

1.2.2 Produção de citocinas e imunoglobulinas

A resposta imunológica gerada pelo processo de imunização de animais com a vacina *hsp65* seguida da infecção com o fungo patogênico *P. brasiliensis*, foi avaliada através das dosagens das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α presentes no sobrenadante de cultura de células de baço. Como demonstrado na **figura 9**,

a imunização com a vacina *hsp65* (DNA-*hsp65*) aumentou significativamente a produção de IL-12 e IFN- γ contribuindo para a eliminação do fungo. As citocinas IL-04 e IL-10 não apresentaram diferença significativa em relação aos animais do grupo NORMAIS. A produção de TNF- α aumentou nos animais imunizados com a vacina *hsp65* e infectados com *P. brasiliensis*, quando comparada com a produção em animais do grupo NORMAIS (Tabela 2).

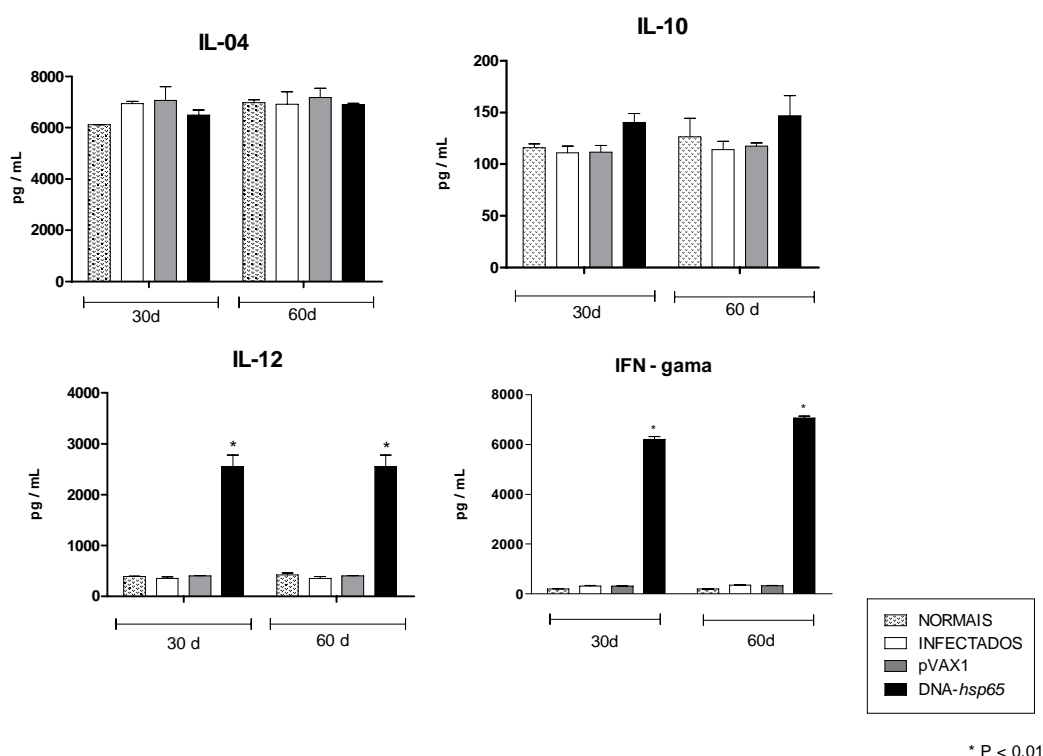


Figura 9 - Padrão de citocinas secretadas após a imunização com vacina DNA-*hsp65* em animais infectados com 10^6 células de *P. brasiliensis*. As dosagens das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- γ foram realizadas pelo método de ELISA. As barras representam as médias em pg / mL \pm SEM dos 10 animais pertencentes aos grupos NORMAIS, INFECTADOS, pVAX1 e DNA-*hsp65*, 30 e 60 dias após a infecção com *P. brasiliensis* (30d e 60d). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * P < 0.01 em relação à produção de citocina dos animais do grupo NORMAIS.

Tabela 2 - Produção de **TNF- α** em animais após a imunização com vacina DNA-*hsp65* e infectados com 10^6 células de *P. brasiliensis*.

Dias após a infecção	Grupos de animais ($n = 10$)	Médias das produções de TNF-α (pg / mL \pm SEM)
30d	NORMAIS	31 \pm 1,6
	INFECTADOS	45 \pm 1,1
	pVAX1	48 \pm 3,4
	DNA- <i>hsp65</i>	*614 \pm 15,2
60d	NORMAIS	39 \pm 3,1
	INFECTADOS	59 \pm 3,1
	pVAX1	54 \pm 2,4
	DNA- <i>hsp65</i>	*637 \pm 18,4

Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * $P < 0.01$ em relação à produção TNF- α com os animais do grupo NORMAIS.

Para avaliar apenas a influência da imunização com o plasmídeo contendo o gene *hsp65* sobre a produção das citocinas analisadas, um grupo de animais ($n = 5$) foi imunizado e não infectado com *P. brasiliensis*. A imunização elevou a produção de todas as citocinas avaliadas (**Tabela 3**); porém, em níveis muito inferiores aos observados após a infecção com o fungo.

Tabela 3 - Produção de citocinas após a imunização com vacina DNA-*hsp65*

Grupo Vacina <i>hsp65</i> (n=5)	Citocinas	Médias das produções de citocinas (pg / mL ± SEM)
NORMAIS (Controle)	IL-04	6642 ± 171
	IL-10	131 ± 10,5
	IL-12	451 ± 14,3
	IFN- γ	197 ± 10,3
	TNF- α	34 ± 4,3
DNA -<i>hsp65</i>	IL-04	*7242 ± 187
	IL-10	*172 ± 6,5
	IL-12	*531 ± 4,2
	IFN- γ	*247 ± 3,3
	TNF- α	*61 ± 6,5

Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * P < 0.01 em relação à produção de citocina dos grupos com os animais do grupo NORMAIS.

Os níveis de imunoglobulinas G (1 e 2a) em soros de animais imunizados com a vacina DNA-*hsp65* e infectados com o fungo patogênico *P. brasiliensis* foram analisados e estão representados na **Figura 10**. Os resultados revelaram níveis elevados de IgG2a em animais imunizados com a vacina *hsp65* e infectados com *P. brasiliensis*.

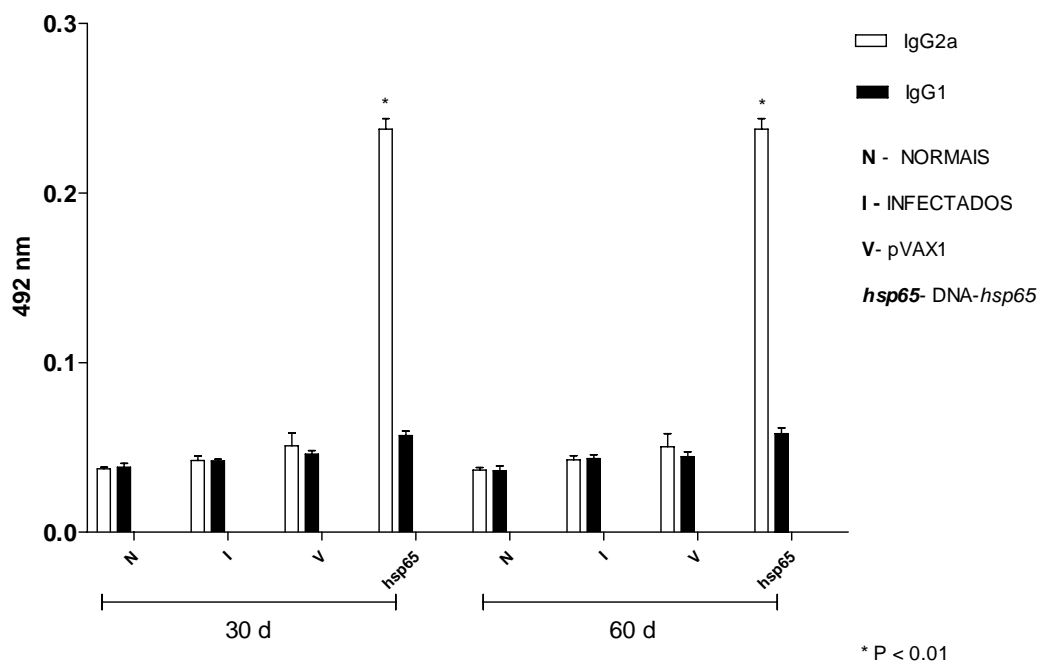


Figura 10 - Níveis de **IgG2a** e **IgG1** (reação com rHSP65) em soro de animais imunizados com a vacina DNA-*hsp65* e infectados com 10^6 células de *P. brasiliensis*. As barras representam as médias das produções de IgG2a e IgG1 \pm SEM dos 10 animais pertencentes aos grupos NORMAIS, INFECTADOS, pVAX1 e DNA-*hsp65*, 30 e 60 dias após a infecção com *P. brasiliensis* (30d e 60d). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * $P < 0.01$ em relação à produção de IgGs dos grupos com os animais NORMAIS.

1.2.3 Produção de NO_3 e NO_2

A infecção experimental pelo *P. brasiliensis* cursa com a produção de NO, quantificado pela presença de nitrito (sobrenadante de cultura de células) e nitrato (soro).

Após 30 dias de infecção (30d), animais dos grupos INFECTADOS ($26 \pm 1,7 \mu\text{M}$ de NO_2) e pVAX1 ($25 \pm 1,7 \mu\text{M}$ de NO_2) apresentaram produção de NO_2 similar aos animais do grupo NORMAIS ($20 \pm 1,7 \mu\text{M}$ de NO_2). Entretanto, os animais imunizados com a vacina DNA-*hsp65* ($112 \pm 2,6 \mu\text{M}$ de NO_2) aumentaram significativamente a produção de NO_2 . Os resultados após 60 dias de infecção (60d) foram similares aos observados com 30 dias de infecção (30d) com *P. brasiliensis* (**Figura 11**). O mesmo perfil foi observado com a produção de nitrato onde após 30 dias de infecção (30d), animais dos grupos INFECTADOS ($10 \pm 0,5 \mu\text{M}$ de NO_3) e pVAX1 ($9,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$ de NO_3) apresentaram produção de NO_3 pouco aumentada quando comparada à produção dos animais do grupo NORMAIS ($7 \pm 1 \mu\text{M}$ de NO_3), estatisticamente semelhantes. Entretanto, os animais imunizados com a vacina DNA-*hsp65* ($40 \pm 1,7 \mu\text{M}$ de NO_3) aumentaram

significativamente a produção de NO_3 . Os resultados após 60 dias de infecção foram similares aos observados com 30 dias de infecção com *P. brasiliensis* (**Figura 11**).

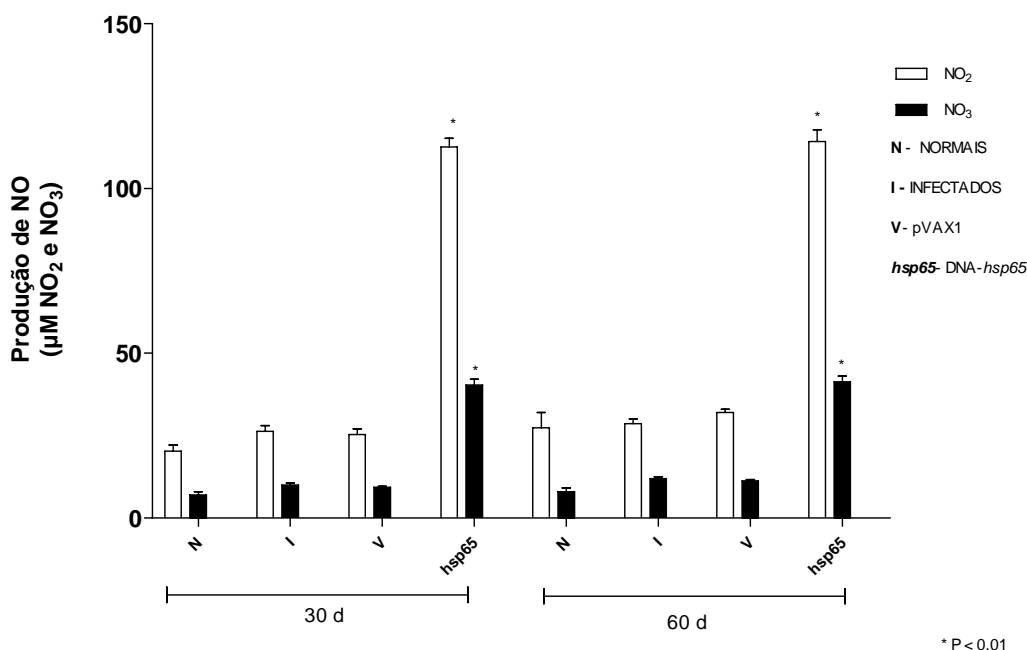


Figura 11- Produção de Óxido Nítrico (NO) em sobrenadantes de culturas de esplenócitos (NO_2) e soro (NO_3) de animais imunizados e infectados com 10^6 células de *P. brasiliensis*. As barras representam as médias em μM de NO_3 ou de $\text{NO}_2 \pm \text{SEM}$ dos 10 animais pertencentes aos grupos NORMAIS, INFECTADOS, pVAX1 e DNA-*hsp65*, 30 e 60 dias após a infecção com *P. brasiliensis* (30d e 60d). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * $P < 0.01$ em relação à produção de NO dos grupos com os animais NORMAIS.

2. Tratamento com a vacina DNA-*hsp65*

2.1 Análise histopatológica e Recuperação/Quantificação fúngica pulmonar

As análises histopatológicas de fragmentos de pulmão obtidos dos animais que foram infectados com *P. brasiliensis* e, após 60 dias da infecção, receberam 4 doses da solução de sacarose (grupo INFECTADOS) ou do vetor vazio (grupo pVAX1) apresentaram o padrão histológico característico, sem interferir no curso do processo inflamatório granulomatoso (**Figura 12A**).

Os animais que foram infectados e, após 60 dias, receberam 4 doses do vetor contendo o gene *hsp65* (DNA-*hsp65*) apresentaram um menor comprometimento tecidual (**Figura 12B**), com a presença de um agregado linfocitário envolvendo um menor número de leveduras, sugerindo o controle da infecção. A presença de

colágeno foi menor nos animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com a vacina DNA-*hsp65* (**Figura 12D**), comparada com a observada nos animais tratados com o vetor (grupo pVAX1) (**Figura 12C**).

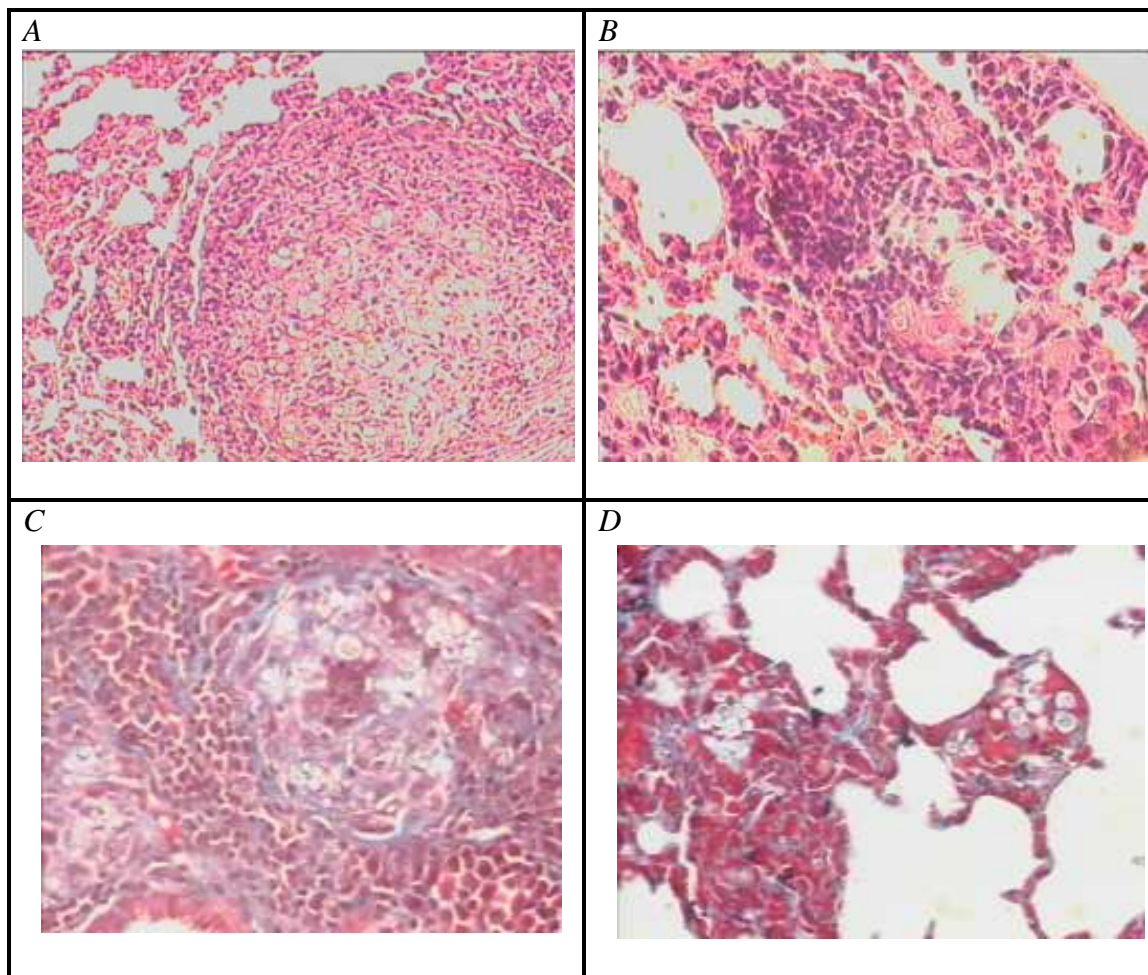


Figura 12 – Cortes histopatológicos de animais dos grupos pVAX1 e DNA-*hsp65* com 60 dias de infecção com *P. brasiliensis* (ensaios de tratamento). **A** – Coloração HE, animal do grupo pVAX1, aumento 20x. **B** - Coloração HE, animal do grupo DNA-*hsp65*, aumento 40x. **C** - Coloração *masson* (colágeno), animal do grupo pVAX1, aumento 20x. **D** - Coloração *masson* (colágeno), animal do grupo DNA-*hsp65*, aumento 20x.

A carga fúngica no pulmão dos animais dos diferentes grupos foi avaliada e está demonstrada na Figura 12. A quantidade de fungos no pulmão dos animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com sacarose (grupo INFECTADOS, 61 ± 3 UFCs g / pulmão) ou com o vetor vazio (grupo pVAX1, $66 \pm 3,1$ UFCs g / pulmão) foram equivalentes, não apresentaram diferença significativa (**Figura 13**).

Os animais infectados e tratados com a vacina DNA-hsp65 ($31 \pm 3,2$ UFCs g / pulmão) apresentaram redução significativa na carga fúngica pulmonar, cerca de 50%, quando comparada à observada no grupo de animais INFECTADOS (**Figura 13**).

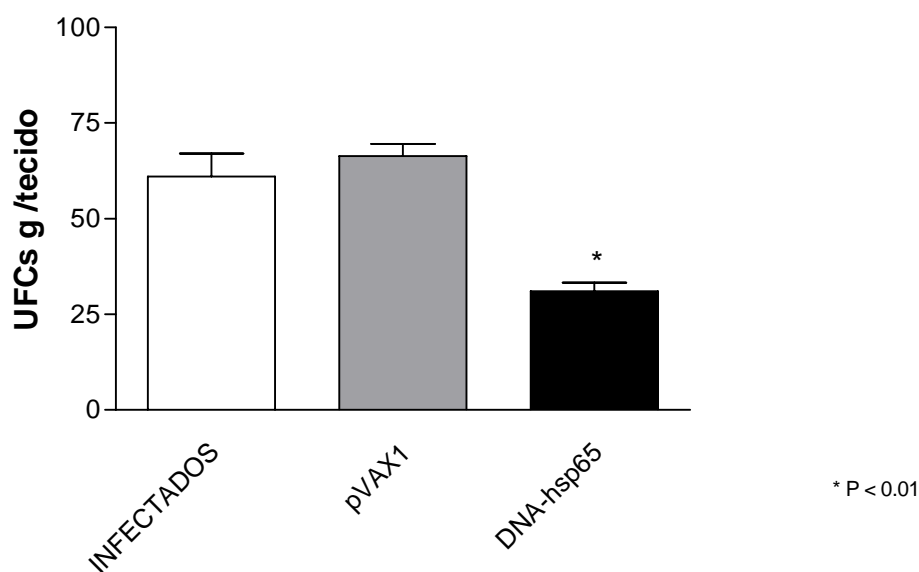


Figura 13 – Quantificação fúngica pulmonar em animais infectados com 10^6 células de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina DNA-hsp65. As barras representam as médias de contagens de UFCs g / tecido \pm SEM dos 10 animais pertencentes aos grupos INFECTADOS, pVAX1 e DNA-hsp65. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * $P < 0.01$ em relação a carga fúngica pulmonar dos animais do grupo INFECTADOS.

2.2 Padrão de resposta imunológica

2.2.1 Capacidade linfoproliferativa

Ensaio de proliferação de esplenócitos também foram realizados com culturas de células dos animais tratados dos diferentes grupos (**Figura 14**). Quando comparados aos animais do grupo NORMAIS (66.291 ± 2.008 CPM / células), os animais dos grupos INFECTADOS (20.731 ± 1.126 CPM / células) e pVAX1 (23.275 ± 1.369 CPM / células) apresentaram redução na sua capacidade linfoproliferativa quando

estimulados com Con-A. Entretanto, o tratamento com a vacina DNA-*hsp65* (47.773 ± 2.975 CPM / células) mostrou-se capaz de recuperar a proliferação dos esplenócitos dos animais (**Figura 14**).

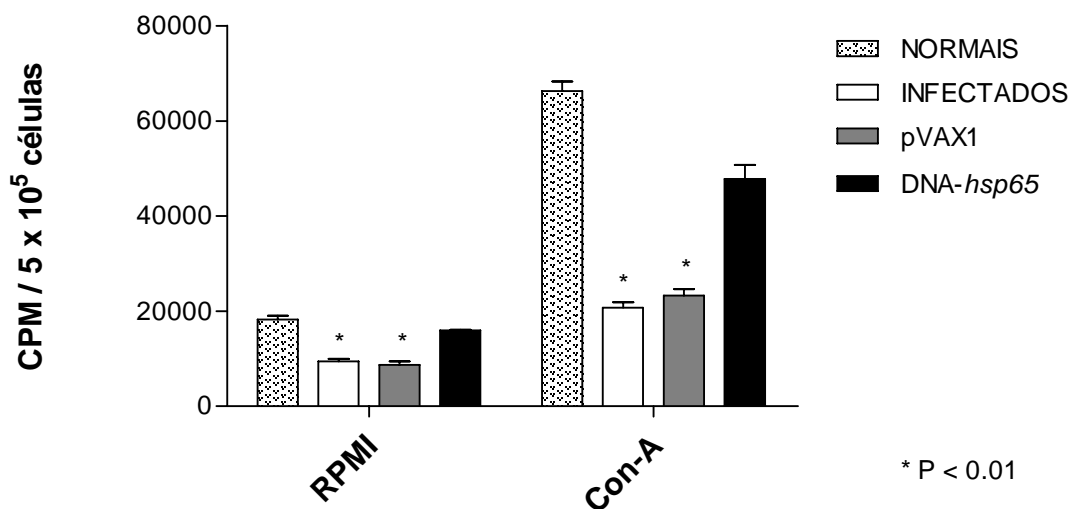


Figura 14 – Resposta proliferativa de cultura de esplenócitos obtidos de camundongos infectados com 10^6 células de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina DNA-*hsp65*. Culturas de esplenócitos foram estimuladas com Con-A ou mantidas em meio de cultura RPMI (não estimuladas). As barras representam as médias em CPM / células \pm SEM dos 10 animais pertencentes aos grupos NORMAIS, INFECTADOS, pVAX1 e DNA-*hsp65*, 60 dias após a infecção com *P. brasiliensis*. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * P < 0.01 em relação à proliferação celular dos grupos com os animais do grupo NORMAIS.

2.2.2 Produção de citocinas e imunoglobulinas

A resposta imunológica gerada após os diferentes tratamentos dos animais infectados com *P. brasiliensis* foi avaliada através das dosagens de citocinas produzidas em cultura de células de baço. Como demonstrado na **figura 15**, o tratamento também aumentou significativamente a produção de citocinas IL-12 e IFN- γ e as produções de IL-4 e IL-10 não.

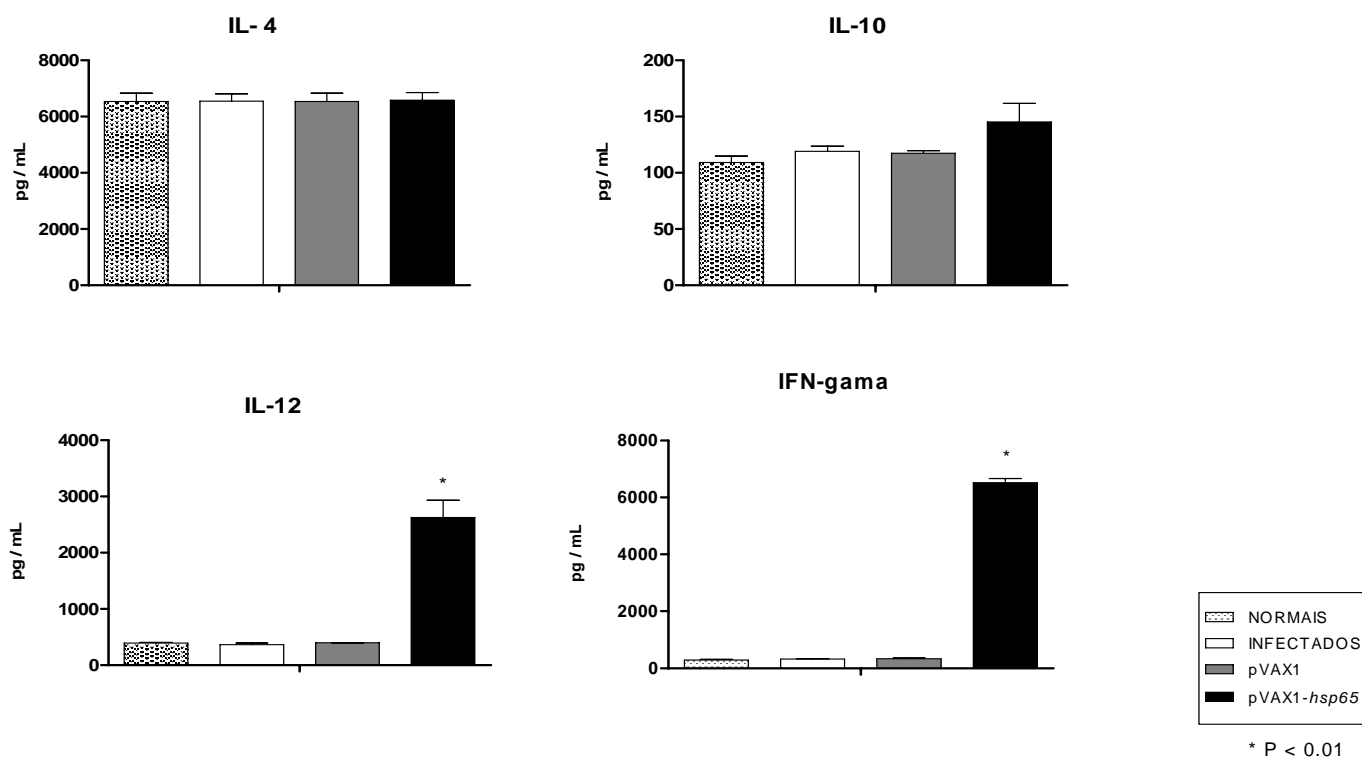


Figura 15 - Padrão de citocinas secretadas após o tratamento com vacina DNA-*hsp65* em animais infectados com 10^6 células de *P. brasiliensis*. As dosagens das citocinas **IL-12**, **IFN- γ** , **IL-4** e **IL-10**, foram realizadas pelo método de ELISA. As barras representam as médias em pg / mL \pm SEM dos 10 animais pertencentes aos grupos NORMAIS, INFECTADOS, pVAX1 e DNA-*hsp65*, 60 dias após a infecção com *P. brasiliensis*. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * P < 0.01 em relação à produção de citocina dos animais do grupo NORMAIS.

A produção de TNF- α também aumentou nos animais tratados com a vacina *hsp65* comparada à produção observada nos animais dos demais grupos (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Produção de **TNF- α** após o tratamento com vacina **DNA-*hsp65***

Grupos (<i>n</i> =10)	Médias das produções de TNF-α (pg / mL \pm SEM)
NORMAIS	33 \pm 2,1
INFECTADOS	53 \pm 1,8
pVAX1	51 \pm 0,8
DNA-<i>hsp65</i>	*644,5 \pm 19,1

Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * $P < 0.01$ em relação à produção de citocina dos grupos com os animais do grupo **NORMAIS**.

Os níveis de imunoglobulinas G (1 e 2a) em soros de animais infectados e tratados foram analisados e estão representados na **Figura 16**. Os resultados revelaram níveis elevados de IgG2a nos animais infectados e tratados com a vacina **DNA-*hsp65***.

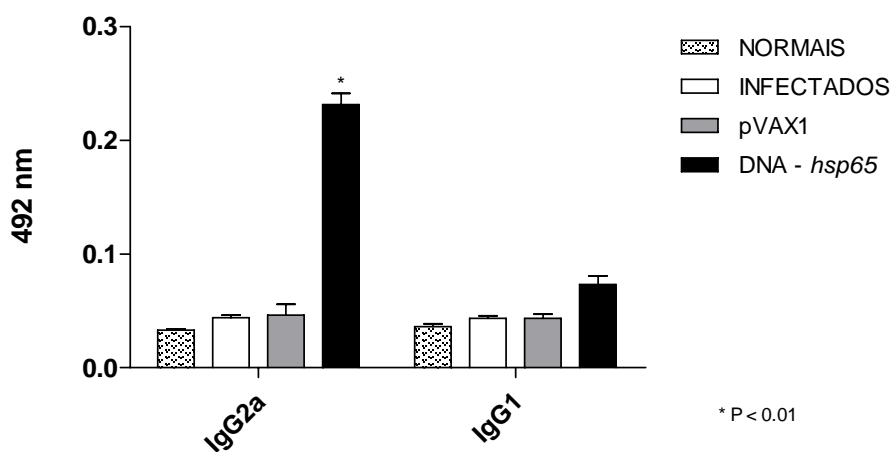


Figura 16 - Níveis de **IgG2a** e **IgG1** (reação com HSP65 recombinante) em soro de animais infectados com 10^6 células de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina **DNA-*hsp65***. As barras representam as médias das produções de IgG2a e IgG1 \pm SEM dos 10 animais pertencentes aos grupos **NORMAIS**, **INFECTADOS**, **pVAX1** e **DNA-*hsp65***, 60 dias após a infecção com *P. brasiliensis*. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * $P < 0.01$ em relação à produção de IgGs dos grupos com os animais **NORMAIS**.

2.2.3 Produção de NO₃ e NO₂

Animais dos grupos INFECTADOS ($27 \pm 0,8 \mu\text{M}$ de NO₂) e pVAX1 ($23 \pm 0,8 \mu\text{M}$ de NO₂) apresentaram produção de NO₂ similar aos animais do grupo NORMAIS ($20 \pm 0,3 \mu\text{M}$ de NO₂). Entretanto, os animais tratados com a vacina DNA-*hsp65* ($116 \pm 2 \mu\text{M}$ de NO₂) aumentaram significativamente a produção de NO₂. A **figura 17** contém os valores das produções de NO₂, expressos em μM , utilizando a vacina DNA-*hsp65*. O mesmo perfil foi observado com a produção de nitrato. Animais dos grupos INFECTADOS ($12 \pm 0,8 \mu\text{M}$ de NO₃) e pVAX1 ($13 \pm 1 \mu\text{M}$ de NO₃) apresentaram produção de NO₃ pouco aumentada quando comparada com a produção observada nos animais do grupo NORMAIS ($7 \pm 0,8 \mu\text{M}$ de NO₃), estatisticamente semelhantes. Entretanto, os animais imunizados com a vacina DNA-*hsp65* ($38 \pm 1,2 \mu\text{M}$ de NO₃) aumentaram significativamente a produção de NO₃.

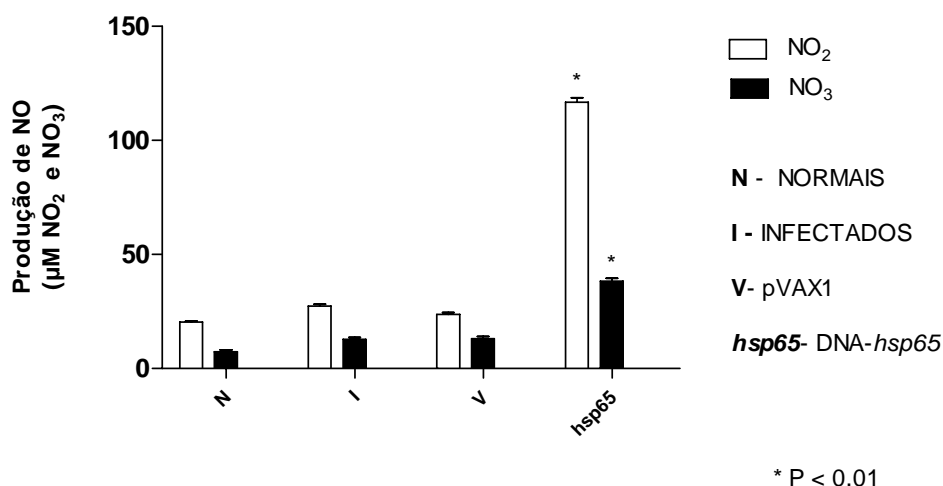


Figura 17 - Produção de Óxido Nítrico (NO) em sobrenadantes de culturas de esplenócitos (NO₂) e soro (NO₃) de animais infectados com 10^6 células de *P. brasiliensis* e tratados com a vacina pVAX1-*hsp65*. As barras representam as médias em μM de NO₃ ou μM de NO₂ \pm SEM dos 10 animais pertencentes aos grupos NORMAIS, INFECTADOS, pVAX1 e DNA-*hsp65*, 60 dias após a infecção com *P. brasiliensis* (60d). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * P < 0.01 em relação à produção de NO dos grupos com os animais NORMAIS.

3. Western Blot

O ensaio de *western blot*, realizado 60 após a infecção com *P. brasiliensis*, mostrou que os animais imunizados com a vacina DNA-*hsp65* produziram anticorpos contra a proteína HSP65 como mostra a **figura 18, poço 6**. Anticorpos produzidos pelos animais imunizados ou tratados após a infecção com *P. brasiliensis*

também foram observados. A **Figura 18, poços 4, 7 e 10** representam, respectivamente, soro de animais imunizados com a vacina DNA-*hsp65* e com 60 dias de infecção, soro de animais tratados com a vacina após a infecção com *P. brasiliensis* e soro de animais infectados (controle positivo). Os controles negativos do ensaio, soro de animais normais, não produziram anticorpo contra o *P. brasiliensis* e também não produziram anticorpo contra a HSP65, como era esperado. A produção de anticorpos no soro de animais tratados com DNA-*hsp65* e infectados com *P. brasiliensis* foi verificada na figura 14 (IgG2a), mas, não foi observada na análise por *western blot*. Da mesma forma, os animais infectados (imunizados ou tratados) não reconheceram especificamente a Gp43, como mostra a **figura 18, poços 5, 8 e 11**, apesar de os soros de animais imunizados ou tratados reconhecerem o extrato bruto de parede do *P. brasiliensis* (**Figura 18, poços 5, 8 e 11**).

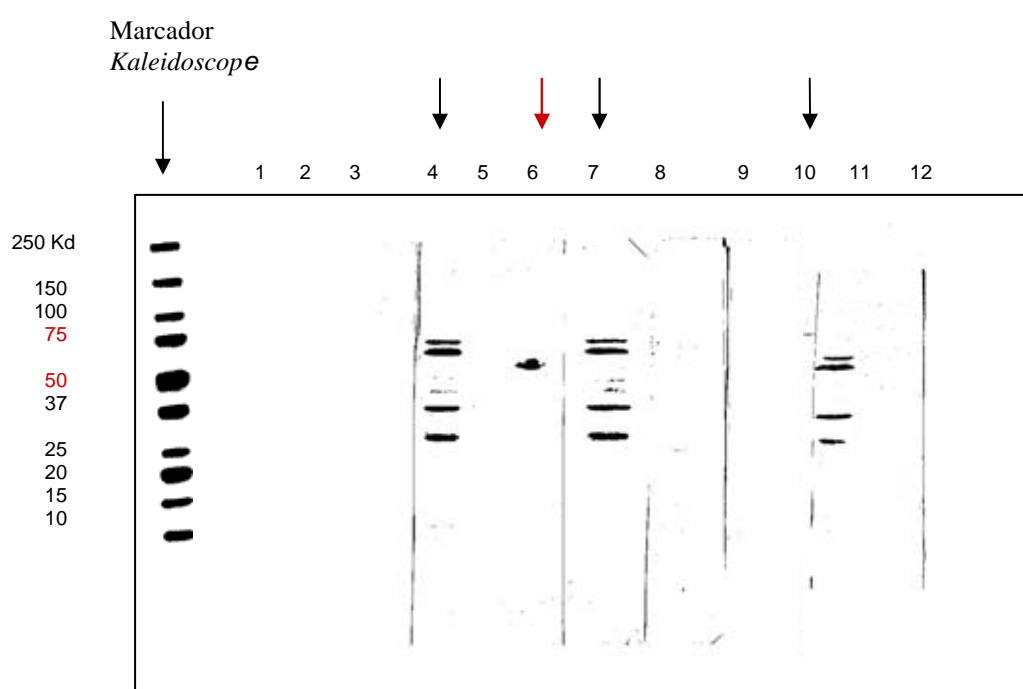


Figura 18 – Análise da produção de anticorpos de animais imunizados ou tratados com a vacina DNA-*hsp65* e infectados com *P. brasiliensis*. Amostra aplicada no gel SDS-PAGE / Incubação :1- Extrato bruto *P. brasiliensis* 18/ soro de animais normais; 2- Gp43 *P. brasiliensis* 339 / soro de animais normais; 3- HSP65 / soro de animais normais; 4- Extrato bruto *P. brasiliensis* 18 / soro de animais imunizados 60d; 5- Gp43 *P. brasiliensis* 339 / soro de animais imunizados 60d; 6- HSP65 / soro de animais imunizados 60d; 7- Extrato bruto *P. brasiliensis* 18 / soro de animais tratados; 8- Gp43 *P. brasiliensis* 339 / soro de animais tratados; 9- HSP65 / soro de animais tratados; 10- Extrato bruto *P. brasiliensis* 18 / soro de animais infectados – controle positivo; 11- Gp43 *P. brasiliensis* 339 / anti Gp43 (soro de animais infectados) – controle positivo; 12- HSP65 / anti-HSP65 - controle positivo.

V. Discussão

Considerando o aumento na incidência de micoses sistêmicas e oportunistas no mundo inteiro relacionado ao aparecimento de isolados resistentes aos antifúngicos e, principalmente, em indivíduos imunossuprimidos, a busca por novas alternativas de prevenção e, principalmente, de tratamento para estas doenças tornou-se de grande importância para a saúde pública (Chakrabarti, 2005). A terapia antifúngica convencional é limitada pelos efeitos tóxicos ao organismo, baixa eficácia e elevadas taxas de resistência aos fármacos. Esses fatores interferem de maneira negativa no sucesso dos tratamentos tradicionais das micoses. Dentre as drogas utilizadas, os triazólicos, sobretudo o fluconazol e o itraconazol, possuem um largo espectro de ação e efeitos tóxicos bastante reduzidos, porém pela sua freqüente utilização, tem-se observado resistência entre os fungos, principalmente por várias espécies de *Cândida* (Carrillo-Muñoz e colaboradores, 2006). Outros antifúngicos bastante utilizados nas micoses sistêmicas são a anfotericina B, o clotrimazol e o cetoconal, (Shikanai-Yasuda e colaboradores, 2006). A anfotericina B, importante quimioterápico utilizado atualmente, foi introduzido na década de 1950 e, até os dias atuais, é a droga indicada para o tratamento dos casos mais graves de micoses sistêmicas (Nosanchuk, 2006). A anfotericina B apresenta qualidades como seu amplo espectro antifúngico. Casos de resistência também são raros, porém, apresenta sérios efeitos tóxicos ao organismo (Atkinson e Bennett, 1978; Fukui e colaboradores, 2003). Diante dessas dificuldades, novas abordagens para a prevenção e para o tratamento de micoses sistêmicas precisam ser desenvolvidas.

A vacinação é uma importante intervenção destinada a prevenir doenças no mundo inteiro. Estudos visando a busca de novos genes de patógenos responsáveis pela virulência ou imunogenicidade são de grande relevância como podemos citar as HSPs, conhecidas pela sua capacidade imunogênica, que também estão sendo estudadas como vacinas terapêuticas, em modelos experimentais, para o tratamento de diversas doenças como hepatite B (Gu e colaboradores, 2007), câncer (Peibin e colaboradores, 2002) e AIDS (Brenner e colaboradores, 2001 e SenGupta e colaboradores, 2004) e mais recentemente, auxiliando no tratamento do câncer (Roman e colaboradores, 2007) e da AIDS (SenGupta e colaboradores, 2004). Heikema e colaboradores (1997) mostraram que a imunização de camundongos com complexos HSP70-peptídeos purificados de células infectadas com vírus influenza gera uma forte resposta CD8+ específica para os peptídeos virais. Dessa forma, a HSP70 tem o importante papel de dirigir os peptídeos para o MHC I, promovendo uma resposta citotóxica mediada por células T CD8+ específicas para os peptídeos virais (Srivastava, 1997). Estudos em células B humanas verificaram a formação de complexos entre a HSP-gp96 e peptídeos imunogênicos (Gag-p24) de classe I e classe II (SenGupta e colaboradores, 2004). A formação desses complexos favorece a apresentação antigênica (Massa e colaboradores 2005). Roman e colaboradores (2007) mostraram que a vacina com a HSP-7 induziu regressão nas lesões em pacientes com elevado nível de neoplasia intraepitelial.

Para as doenças fúngicas, diferentes genes têm sido investigados (Cutler e colaboradores, 2007) e vacinas utilizando as HSPs foram testadas para as doenças fúngicas causadas pela *C. albicans* e *H. capsulatum*. Em modelo experimental para candidíase, a proteção por anticorpos pode ocorrer através do reconhecimento de proteínas específicas como a HSP90 (Matthews e colaboradores 1991; Matthews e colaboradores, 1995; Cutler e colaboradores, 2007). Raska e colaboradores (2005) utilizaram não só a proteína recombinante HSP90 de *C. albicans* como também, o gene que expressa esta proteína para imunizar animais com candidíase sistêmica. observaram que a resposta obtida quando os animais foram imunizados com a proteína foi mais promissora. A HSP60 recombinante (rHSP60) induziu resistência em animais imunocompetentes infectados experimentalmente com *H. capsulatum* sendo que as células T CD4 + e citocinas de padrão Th1 são importantes na indução e manutenção da proteção dos animais imunizados (Deepe e Gibbons, 2002; Cutler e colaboradores, 2007). As vacinas de DNA, utilizando as HSP precisam ser testadas para outras doenças fúngicas, como por exemplo, a PCM.

Respostas imunológicas mediadas por células desempenham um papel importante na resistência ao *P. brasiliensis* (Kashino e colaboradores, 2000; Kurokawa e colaboradores, 2007). Pacientes com PCM sistêmica apresentam uma resposta imunológica celular deprimida quando comparados àqueles com doença localizada (Mota e colaboradores, 1988). Além disso, as formas mais graves de infecção estão associadas com altos níveis de anticorpos específicos (Camargo e colaboradores, 1994). Animais resistentes a PCM mostraram uma resposta, preferencialmente, de padrão Th1 com produção elevada de IFN- γ (Cano e colaboradores, 1995; Cano e colaboradores, 1998; Pinto e colaboradores, 2000; Pina e colaboradores, 2004, Martins do Nascimento e colaboradores, 2007). Experimentos realizados em camundongos infectados com *P. brasiliensis* e tratados com anti-IFN- γ revelaram um agravamento da infecção fúngica pulmonar (Cano e colaboradores, 1998). Souto e colaboradores (2000), usando camundongos geneticamente deficientes em IFN- γ ou TNF- α receptor p55, demonstraram que ambos estão envolvidos na resistência à infecção pelo *P. brasiliensis*, na formação do granuloma e no controle da disseminação do fungo. Outro estudo, utilizando animais geneticamente deficientes em IL-4, mostrou que estes animais desenvolveram uma doença menos severa quando comparados a animais controle (normais) e esse efeito está associado a uma resposta imunológica diminuída do tipo Th2 (Pina e colaboradores, 2004).

Os resultados apresentados, tanto nos ensaios de imunização como nos de tratamento, corroboram, com dados da literatura, que a vacina de DNA, utilizando o gene *hsp65* de *M. leprae*, conduziu a uma resposta protetora em modelos experimentais, proporcionando uma redução do processo infeccioso (Silva e colaboradores, 1999; Coelho e colaboradores, 2006; Fonseca e colaboradores, 2007).

A vacina de DNA utilizando o gene *hsp65* de *M. leprae* apresentou proteção contra a tuberculose (Lowrie e colaboradores, 1999; Silva e colaboradores, 2005), a artrite reumatóide (Santos - Junior e colaboradores, 2005), a leishmaniose (Coelho e colaboradores, 2006) e a aterosclerose (Fonseca e

colaboradores, 2007). Em todos esses modelos estudados, houve um padrão protetor consistente de resposta imunológica, padrão Th1, para tais modelos, e capaz de controlar e proteger sendo que no modelo de tuberculose murina os autores afirmaram que houve cura dos animais infectados. Nesse contexto, testou-se a vacina em um modelo de doença fúngica pulmonar, a PCM, em ensaios de imunização e de tratamento. A construção de DNA contendo o gene *hsp65* do *M. leprae* foi testada como terapia gênica para a prevenção ou tratamento da PCM. Anteriormente, a vacina de DNA-Gp43 para PCM foi descrita na literatura como agente imunogênico de camundongos posteriormente infectados com o fungo (Pinto e colaboradores, 2000). Assim como a vacina de DNA utilizando o gene da Gp43, a vacina DNA-*hsp65* também reduziu a carga fúngica pulmonar. Além disso, para ambas as vacinas, os animais apresentaram elevadas secreções de IFN- γ (Pinto e colaboradores, 2000). Porém, os animais imunizados ou tratados com a vacina *hsp65* também apresentaram níveis aumentados de outra citocina importante para a resposta celular, a IL-12. Romano e colaboradores (2002) mostraram, em animais, que a produção deficiente de IL-12 está associada à redução da proliferação celular e ao desenvolvimento de uma doença mais severa. Diferentemente dos animais imunizados por meio da vacina Gp43, os resultados apresentados neste trabalho mostraram que houve uma polarização consistente da resposta imunológica para um padrão Th1, com níveis elevados de IFN- γ , TNF- α e IgG2a. Animais que receberam apenas as doses da vacina de DNA-*hsp65* e não foram infectados apresentaram aumento na produção de todas as citocinas analisadas, tanto de padrão Th1 como de padrão Th2. Este dado mostra que não há uma polarização gerada na resposta imunológica apenas com a administração da vacina e sim após o animal ser infectado com o fungo. A vacina *hsp65* estimula o sistema imunológico e eleva as produções de citocinas sendo que após a infecção, ocorre uma modulação nessa resposta, levando a um padrão protetor para o hospedeiro. Foi verificada, pela análise por *Western Blot*, neste trabalho, a produção de diversos anticorpos nos soros dos animais, após a infecção com *P. brasiliensis*, inclusive específica para a rHSP65 em animais imunizados. As análises histopatológicas confirmam a proteção conferida pela vacina *hsp65* aos tecidos pulmonares menos comprometidos pela infecção com *P. brasiliensis*. Além da presença do fungo, este trabalho mostrou áreas com maior concentração de colágeno nos pulmões de animais não imunizados ou não tratados com a vacina *hsp65*. Esse dado é importante, pois a deposição de colágeno está relacionada à fibrose pulmonar, uma das conseqüências mais graves da doença PCM (Cock e colaboradores, 2000). A fibrose pulmonar é causada pela produção excessiva de fibras colágenas que são produzidas pelos fibroblastos e, podem ser ativados para produzir ainda mais colágeno. A fibrose formada nos tecidos afetados causa danos celulares, diminuição da flexibilidade e disfunção dos tecidos ou órgãos afetados (Franco, 1998; Cock e colaboradores, 2000). Portanto, animais imunizados ou tratados com a vacina *hsp65* apresentam menor quantidade de fungos nos pulmões, com menor deposição de colágeno, caracterizando um padrão protetor no curso da PCM.

Outro aspecto importante nos resultados obtidos com a vacina *hsp65* foi a elevada produção de óxido nítrico (NO) nos animais imunizados ou tratados e infectados com *P. brasiliensis*. Possivelmente, o NO

contribuiu para a eliminação do fungo, protegendo os animais, pois a elevação dos níveis, tanto plasmáticos como em culturas de células, foi significativa. O NO é uma molécula antimicrobiana de grande relevância e envolvida no combate de fungos patogênicos, como o *P. brasiliensis*, de leveduras e de conídios (Bocca e colaboradores, 1998; Cano e colaboradores, 2000). Outro resultado relevante foi o restabelecimento da capacidade linfoproliferativa das células dos animais imunizados ou tratados com a vacina *hsp65*. Os animais infectados reduziram sua capacidade linfoproliferativa, o que está de acordo com a infecção com *P. brasiliensis* (Mussati e colaboradores, 1994) e a vacina *hsp65* conferiu proteção ao animal, recuperando a sua capacidade proliferativa. Os nossos dados, em conjunto, reproduzem resultados alcançados anteriormente para outras doenças e abrem caminhos para novas abordagens principalmente no tratamento de doenças fúngicas. Além disso, novas abordagens da vacina *hsp65* podem otimizar os resultados observados na imunização e no tratamento apresentados neste trabalho podendo levar à cura e à eliminação total do fungo e não apenas à proteção e ao controle da infecção.

A imunidade adquirida por intermédio do tratamento com a vacina DNA-*hsp65* persiste por longo período de tempo, devido tanto à constante produção do antígeno dentro da célula hospedeira como à sua capacidade de estimular linfócitos de memória imunológica, sendo assim desnecessárias as re-vacinações (Silva e colaboradores, 1999; Coelho-Castelo e colaboradores, 2006, Trombone e colaboradores, 2007). Estudos foram conduzidos no sentido de melhor caracterizar as subpopulações celulares associadas ao controle do processo infeccioso, os mediadores envolvidos, as interleucinas e as funções efetoras desencadeadas no decorrer do processo de ativação celular (Ruberti e colaboradores, 2004). A biodistribuição do DNA *hsp65* administrado foi monitorada por 6 meses em diversos tecidos e órgãos e verificando-se uma ampla distribuição, e de longa duração, tanto na forma nua (Coelho – Castelo e colaboradores, 2006) como na forma encapsulada (Trombone e colaboradores, 2007). Além disso, Coelho-Castelo e colaboradores (2006) mostraram que a vacina de DNA-*hsp65* não se integra ao genoma do hospedeiro e, portanto, traz-nos uma informação de grande utilidade, possibilitando a continuidade dos estudos com esta vacina. A possibilidade de integração do plasmídeo ao genoma hospedeiro de maneira danosa pode gerar patogenias, especialmente se este se integrar em células somáticas, gerando mutagênese por inserção. As vacinas de DNA oferecem também uma série de vantagens econômicas, técnicas e logísticas quando comparado ao uso das vacinas clássicas, especialmente se considerarmos a sua utilização nas condições oferecidas pelos países em desenvolvimento. Por exemplo, a produção em larga escala é bem mais barata, a manutenção do controle de qualidade é mais fácil e a comercialização não necessita de uma rede de refrigeração, pois essas vacinas são estáveis à temperatura ambiente.

As vacinas de DNA apresentam-se promissoras no tratamento de infecções fúngicas porque permite restabelecer a imunidade celular deprimida no curso da doença. O tratamento convencional, apesar de reduzir a carga fúngica nos tecidos, não restabelece a resposta imunológica protetora. Recentemente, tem-se

utilizado drogas nanoestruturadas que apesar, de reduzir a toxicidade da droga, não melhora a resposta imunológica celular deprimida (Amaral e colaboradores, artigo submetido).

A vacina DNA-*hsp65* encapsulada em microesferas biodegradáveis, em modelo animal de leishmaniose apresentou-se mais eficiente quando comparada com a vacina não encapsulada. Essa diferença pode ter ocorrido devido à ação de endonucleases na degradação do DNA no caminho da vacina não encapsulada após a mesma ter sido administrada no tecido muscular (Manthorpe e colaboradores, 1993; Levy e colaboradores, 1996).

O encapsulamento da vacina DNA-*hsp65* mostrou-se efetiva também no tratamento de animais infectados com o *M. tuberculosis* quando foi utilizada a técnica do prime-boost (Silva CL, comunicação pessoal). Nesta técnica, o hospedeiro é tratado com uma preparação contendo duas microesferas de PLGA (polímeros de ácido poliláctico-co-glicólico), uma com o DNA-*hsp65* de *M. leprae* e outra com a proteína recombinante HSP65, sendo que cada uma apresenta um tempo de liberação diferente (Paula e colaboradores, 2007).

A associação de fármacos com o DNA-*hsp65* encapsulados para o tratamento da tuberculose, em modelo experimental, apresentou tanto uma cura mais rápida como a eliminação total dos bacilos com 3 meses de tratamento e a persistência de uma resposta celular depois de 60 dias de tratamento (Silva CL, comunicação pessoal). Portanto, a vacina de DNA-*hsp65* utilizada em conjunto com fármacos, encapsulados ou não, apresentam-se como perspectivas importantes para o tratamento de diversas doenças.

Nossos resultados são promissores no contexto das novas estratégias para o combate de micoses sistêmicas. A vacina *hsp65* pode ser uma esperança para outras micoses sistêmicas. A mesma é candidata atrativa para a prevenção, tratamento e/ou como adjuvante às drogas convencionais. Novos estudos sobre a vacina *hsp65* são necessários e contribuirão para a melhor compreensão do seu mecanismo de ação e para corroborar a segurança dessa vacina em relação à imunogenicidade, carcinogenicidade, autoimunidade, tolerância e biodisponibilidade.

VI. Conclusão

Portanto, a vacina de DNA-*hsp65*, quando administrada por via intramuscular, em animais BALB/c, antes ou após a infecção com *P. brasiliensis* promoveu o aumento da produção de mediadores envolvidos na resposta imunológica celular, considerada uma resposta protetora para PCM.

VII. Produção Durante o Doutorado

Processo tecnológico

Ribeiro, A. M. ; BOCCA, A. L. ; AMARAL, A. ; Galetti F.C.S. ; Felipe, M.S.S . Patente - Uso do imunomodulador plasmidial expressando uma proteína de estresse micobacteriana para o controle de micoses (Titulares Farmacore Biotecnologia Ltda e Fundação Universidade de Brasília). 2007.

INPI – PI0705676-1 (anexo 2).

Artigo a ser submetido

DNA-*hsp65* induces protection in mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **A.M. Ribeiro** , A. L. Bocca , A.C. Amaral , A. A. M. Coelho-Castelo , F. Figueiredo, C. L. Silva , M. S. S. Felipe .

Capítulo de livro

Fernandes, L. ; Bocca, A. L. ; **Ribeiro, A. M.** ; Silva S.S ; Paes H.C. ; Amaral, A. ; Polez, V. P. ; Martins, N. F. ; Soares, C. M. A. ; Felipe, M.S . Regulatory networks in the host-fungal pathogen interaction (in press). In: Gioconda San-Blas; Ruchard Calderone. (Org.). Pathogenic Fungi: Insights in Molecular Biology. – ed. Caister Academic Press, 2007.

Produto tecnológico em colaboração

Amaral, A.C; Bocca, A. L. ; **Ribeiro, A.M.** ; Titze, R. ; Simioni A ; Lavaca, Z; Azevedo, R. B. ; Tedesco, A. C.; Morais, P. C. de; Felipe, M.S.S. Patente - Formulação nanoencapsulada da anfotericina B com ácido dimercaptosuccínico em polímero de ácido polilático-poliglicólico para o tratamento de micoses (titulares - DNAtech, USP e FUB), 2006. INPI – PI0700446-0

Artigo submetido em colaboração

1. NanoAnf: AMB-PLGA nanoparticle for mycoses treatment. André C. Amaral, Anamélia L. Bocca, **Alice M. Ribeiro**, Janayna Nunes, Danielle L. G. Peixoto, Andreza R. Simioni, Zulmira G. M. Lacava, Ricardo Bentes, Ricardo Titze-de-Almeida, Antonio C. Tedesco, Paulo C. de Morais and Maria Sueli S. Felipe.

Outras Participações

Colaboradora do projeto de pesquisa: Imunopatologia da Paracoccidioidomicose: Análise comparativa da resposta imunológica de diferentes isolados do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Projeto de pesquisa de mestrado da aluna Cecília Lívia Falcomer.

Acompanhamento e supervisão de alunos de Iniciação Científica – Ana Camila Oliveira e Isaque Medeiros.

VIII. Perspectivas

Em continuidade aos estudos do doutorado, o tema proposta e aprovado para o pós-doutorado foi :

**Associação da imunoterapia com
Dna-*hps65* e anfotericina B nanoencapsulada
no tratamento de doenças fúngicas.**

Início – 1/04/2008 – CNPq

Coordenador : Dr. Célio Lopes Silva

Pesquisadores envolvidos no projeto :

Profa Dra. Maria Sueli Soares Felipe (UnB)

Profa Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca (UnB)

Prof Dr. Florêncio Figueiredo (UnB/UCB)

André Correa Amaral (UCB/UnB) –doutorando UCB/UnB

IX. Anexos**1- Aprovação no CEUA - UnB**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 27 de março de 2007.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"VACINA DE DNA PARA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL: ATIVIDADE IMUNOGÊNICA E TERAPÊUTICA"**, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Prof. Anamélia Lorenzetti Bocca
Coordenadora do CEUA

2 - Processo tecnológico depositado no dia 18.12.2007

“Uso do imunomodulador plasmidial expressando uma proteína de estresse micobacteriana para o controle de micoses”

RESUMO

“Uso do imunomodulador plasmidial expressando uma proteína de estresse micobacteriana para o controle de micoses”

A presente invenção trata da utilização de uma construção de DNA contendo o gene da proteína de choque térmico (“heat shock protein” ou HSP) de micobactéria no preparo de uma composição medicamentosa ou biofármaco a ser usada para a prevenção, tratamento e/ou cura de micoses em seres humanos e animais. As micobactérias são do gênero *Mycobacterium* e os imunomoduladores obtidos codificam proteínas de estresse micobacteriana de diferentes tamanhos. Os imunomoduladores plasmidiais podem ser usados de maneira isolada ou combinada em formulações medicamentosas/vacinais destinadas ao controle de doenças causadas por fungos, tais como Candidíase, Histoplasmose, Coccidioidomicose, Blastomicose, Sporotricose, Cryptococose, Aspergilose e Paracoccidioidomicose ou Pbmicoses, especialmente as provocadas pelo gênero *Paracoccidioides*, principalmente a espécie *Paracoccidioides brasiliensis*.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção trata da utilização de uma construção de DNA contendo o gene da proteína de choque térmico (“heat shock protein” ou HSP) de micobactéria no preparo de uma composição medicamentosa ou biofármaco a ser usada para a prevenção, tratamento e/ou cura de micoses em seres humanos e animais. As micobactérias são do gênero *Mycobacterium*, principalmente as espécies *M. tuberculosis*, *M. leprae* ou *M. bovis* BCG e os imunomoduladores obtidos codificam proteínas de estresse micobacteriana de diferentes tamanhos, tais como a HSP10 (10 KDa), HSP65 (65 KDa), HSP70 (70 KDa). Particularmente, a HSP utilizada é uma proteína de estresse micobacteriana de 65 KDa de *Mycobacterium leprae* e a construção de DNA de interesse é denominada simplesmente de imunomodulador DNA-HSP65. O presente pedido de patente destina-se a uma composição empregada na produção do biofármaco para utilização em doenças causadas por fungos, tais como Candidíase, Histoplasmose, Blastomicose, Sporotricose, Cryptococose, Aspergilose, Coccidioidomicose e Paracoccidioidomicose ou Pbmicoses, especialmente as provocadas pelo gênero *Paracoccidioides*, principalmente a espécie *Paracoccidioides brasiliensis*.

Tal composição medicamentosa apresenta interesse para a indústria farmacêutica para a manufatura de medicamentos para uso humano e veterinário destinados ao controle de micoses.

ESTADO DA TÉCNICA

A Paracoccidioidomicose (Pbmicosse) é uma micose endêmica da América Latina, sendo o Brasil o país que apresenta o maior número de casos relatados (Brummer, E. e col. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6: 89-117, 1993; Coutinho, Z. e col., Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública*, 18:1441-1454, 2002) e pode ser utilizada como modelo de infecção fúngica. Estimativas mostram que cerca de dez milhões de pessoas possam estar infectadas pelo fungo *Pb*, agente etiológico causador da Pbmicosse (Coutinho, Z. e col., Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública*, 18:1441-1454, 2002). A infecção por este patógeno pode ocorrer pela inalação de conídios produzidos na sua fase de micélio a uma temperatura próxima da ambiente (23°C). Quando estes pequenos propágulos atingem os pulmões, encontram uma temperatura capaz de induzir a sua transformação para a fase de levedura, a 36°C, ocasionando a doença (Restrepo, A. The ecology of Paracoccidioides brasiliensis: a puzzle still unsolved. *Med. Vet. Mycol.*, 23: 323-334, 1985; McEwen, J. G. e col., Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *Med. Vet. Mycol.* 25:165-175, 1987). Recentemente foi finalizada a análise do transcriptoma deste patógeno, indicando diferenças transcricionais entre as fases de micélio e levedura (Felipe, M. S. e col., Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J. Biol. Chem.* 2005 Jul 1;280(26):24706-14. Epub 2005 Apr 22).

Geralmente, a Pbmicosse é classificada em: i) Pbmicosse infecção, onde os pacientes não desenvolvem a doença, mas são encontradas células fúngicas em granulomas nos pulmões e fígado; e ii) Pbmicosse doença, encontrada em duas formas, uma aguda e uma crônica. A aguda é caracterizada pelo envolvimento do sistema retículo endotelial e na crônica, o principal órgão acometido é o pulmão (Brummer, E. e col. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6: 89-117, 1993).

As principais drogas utilizadas no tratamento da Pbmicosse são utilizadas em associação trimetropim/sulfametoxazol, itraconazol e cetoconazol e, para as formas graves, inclui o uso de anfotericina B, sendo esta a droga de escolha para o tratamento da maioria das micoses sistêmicas. Algumas características apresentadas por esta molécula, tais como amplo espectro antifúngico, atividade fungicida e raros episódios de resistência, contribuem para o sucesso clínico desta droga. Porém, a anfotericina B apresenta sérios efeitos toxicológicos. Esses efeitos são comumente classificados em agudos, acompanhados por febre, vômito e dores de cabeça, ou subagudos, caracterizado por insuficiência renal (Ostrosky-Zeichner, L. e col., Amphotericin B: time for a new "gold standard" *Clin Infect Dis.* 1;37(3):415-25, 2003).

As diversas composições medicamentosas usadas em diferentes modalidades terapêuticas para a Pbmicosse disponíveis atualmente diminuem a quantidade de fungos no organismo, permitindo a recuperação da imunidade celular, restabelecendo o equilíbrio entre parasita e o hospedeiro, obtendo-se assim uma "cura

aparente”, impossibilitando a erradicação do *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) (Shikanai-Yasuda, M. A, e col., Guidelines in paracoccidioidmycosis *Rev Soc Bras Med Trop.* May-Jun; 39(3):297-310, 2006).

O que motivou a presente invenção foi o fato do Brasil ser o país que apresenta o maior número de casos registrados desta micose e as formulações medicamentosas utilizadas para o seu controle não estarem baseadas na cura completa ou verdadeira dessa doença. Dessa maneira, a procura por uma nova alternativa de controle, que fosse mais segura e mais eficaz, objetivou a presente invenção, a qual está baseada na utilização de uma construção de DNA contendo o gene da proteína de choque térmico de micobactéria, principalmente a HSP65 no preparo de uma composição medicamentosa ou biofármaco a ser usada para a prevenção, tratamento e/ou cura de micoses em seres humanos e animais, devido suas propriedades imunogênica e imunoterapêutica contra a infecção e/ou doença já estabelecida. Além disso, o efeito antifúngico deste agente terapêutico gênico plasmidial mostra ser amplo, tornando-o indicado para o controle de outras micoses e/ou doenças causadas por fungos, como por exemplo, Candidíase, Histoplasmose, Coccidioidomicose, Blastomicose, Sporotricose, Cryptococose, Aspergilose, o que ampliada sua aplicabilidade em formulações medicamentosas destinadas ao tratamento de um número significativo de pacientes com infecções fúngicas tanto no Brasil como no mundo.

O principal problema relacionado com o uso de uma formulação medicamentosa no tratamento da Pbmicose é a “cura aparente”, no qual as drogas utilizadas no combate do *Pb* diminuem a quantidade de fungos no organismo, permitindo a recuperação da imunidade celular e restabelecendo o equilíbrio entre parasita e o hospedeiro, não ocorrendo, entretanto, a erradicação do *Pb*, conforme descrito anteriormente.

Outro problema relacionado ao controle de *Pb* está na ocorrência de casos onde se observa uma adaptação do fungo ao organismo, o qual não desenvolve a doença mesmo estando infectado (Pbmicose infecção). A infecção por *Pb*, normalmente, se estabelece após a inalação de conídios e, quando estes pequenos propágulos atingem os pulmões, encontram uma temperatura capaz de induzir a sua transformação para a fase de levedura, ocasionando a doença. O fungo uma vez dentro do macrófago (células com alto poder microbicida), tem a habilidade de sobreviver e crescer no seu interior. O sistema de defesa imunitário do homem toma conhecimento da presença dos fungos e estabelece uma resposta contra os mesmos, caracterizada por uma reação inflamatória crônica denominada granuloma, e que tem a finalidade de circunscrever e delimitar a infecção. Nessas condições, o *Pb* pode sobreviver por anos em estado de latência e o indivíduo infectado pode não manifestar a doença, o que caracteriza o caso da Pbmicose infecção, citada anteriormente. A doença se manifesta quando há um desequilíbrio dessa relação mútua e freqüentemente está associada com estados de depressão da resposta imunológica. Casos de imunossupressão estão associados a indivíduos com AIDS, alcoólatras e desnutridos, entre outros.

De maneira geral, durante a infecção com *Pb*, o sistema imunológico dos animais fica alterado e não responde de maneira apropriada contra o agente agressor, permitindo o crescimento do fungo e o estabelecimento da doença. Nessas condições estabelecidas pela presença do *Pb*, a utilização de novas

formulações medicamentosas e novos procedimentos terapêuticos, através da administração de imunomoduladores, permitiria uma mudança na modulação na resposta imunológica, criando condições para que o próprio indivíduo ou hospedeiro combata o *Pb*, controlando a infecção, mesmo sem a administração de outros antifúngicos.

Dessa maneira o controle dos fungos latentes (Pbmicose doença) ou dormentes (Pbmicose infecção) pela terapia gênica baseadas no uso de formulações medicamentosas contendo construções de DNA plasmidial ocorre, pois a produção de antígenos é continuada pelas células de memória do sistema imunológico do hospedeiro e, portanto, a terapia proposta pelo uso da presente invenção pode trazer benefícios significativos para o controle da Pbmicose, assim como para doenças fúngicas em geral.

Atualmente, a fisiopatologia da Pbmicose não é totalmente compreendida. Conseqüentemente, o prognóstico dos pacientes é deficiente e os medicamentos disponíveis são insatisfatórios. A necessidade de novas opções terapêuticas para Pbmicose, inclusive o uso de imunomoduladores, como é o caso da presente invenção, é um consenso entre os micologistas e pneumologistas. Terapia gênica utilizada somente como prevenção da infecção ou contra a instalação da doença, foi descrita recentemente utilizando o gene da gp43 em formulações vacinais (Pinto, A. R. e col. DNA-based vaccination against murine Paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* 18: 3050-3058, 2000). A vacina de DNA contendo o gene da gp43 apesar de conferir a proteção ao hospedeiro infectado com o *Pb* e reduzir a carga fúngica, não apresentou um padrão Th1 claramente definido (Pinto, A. R. e col., DNA-based vaccination against murine Paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* 18: 3050-3058, 2000).

Dentre os principais imunomoduladores com possíveis aplicações em formulações medicamentosas na clínica humana e animal estão as proteínas de choque térmico (HSPs). As HSPs são moléculas intracelulares produzidas por eucariotos e procariotos e que funcionam como chaperonas moleculares em muitos processos bioquímicos, como enovelamento e transporte de proteínas, tráfego de peptídeos e processamento de antígeno sob condições fisiológicas e de estresse (Manjili, M. H. e col., Cancer immunotherapy and heat-shock proteins: promises and challenges. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4:363-373, 2004). As HSPs são proteínas de vários pesos moleculares, sendo as principais exemplificadas por HSP20, HSP60, HSP65-68, HSP70, HSP90, HSP110 KDa, entre outras. Algumas dessas HSPs são potentes imunomoduladores, indutoras de imunidade inata e de imunidade antígeno-específica. As HSPs ativam parcialmente células dendríticas através de receptores do tipo “tool-like”, ativam células natural “killer”, aumentam a apresentação de antígenos a células efetoras e a resposta imune humoral e celular. Elas funcionam como “sinal de alerta” que prima por rotas de defesa no hospedeiro e essa função é explorada no desenvolvimento de vacinas para câncer e infecções (Todryk, S. M. e col., Heat shock proteins refine the danger theory. *Immunology*, 99:334-337, 2000).

Durante uma infecção, patógeno e hospedeiro aumentam significativamente suas sínteses de HSPs para se protegerem contra o estresse imposto pelo outro. Em analogia com respostas de célula B a auto-antígenos, é possível prever que células T reativas a HSP, como células T especificamente reconhecendo HSP65, também sejam envolvidas de modo benéfico na resolução de inflamação por remoção de células estressadas.

A ativação de células dendríticas é necessária para o início da resposta imune primária e secundária, induzidas por compostos presentes em patógenos, como DNA, peptídeos, lipídeos ou açúcares, etc., ou por sinais endógenos prejudiciais liberados por tecidos sob estresse ou necrose. Exemplos de sinais endógenos prejudiciais incluem HSPs, nucleotídeos, intermediários reativos de oxigênio, produtos de decomposição da matriz extracelular, neuromediadores e citocinas (como interferons) (Gallucci, S. e Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology*, 13:114-119, 2001; Matzinger, P. Tolerance, danger and the extended family. *Annual Review of Immunology*, 12:991-1045, 1994).

Embora as HSPs derivadas de patógenos possam facilitar a sobrevivência do patógeno no hospedeiro e aumentar a virulência, algumas atuam também como imunoestimulantes no hospedeiro. A HSP70 derivada de *Toxoplasma gondii* induz maturação de células dendríticas e estimula a resposta de IL-12 (Kang, H. K. e col. *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 stimulates the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 322:899-904, 2004). A HSP60 foi identificada como um ligante no fungo *Histoplasma capsulatum* e media a ligação a receptores CD18 em macrófagos humanos (Long, K. H. e col., Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*) that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *Journal of Immunology*, 170:487-494, 2003). A imunização de camundongos com HSP60 recombinante de *H. capsulatum* conferiu proteção a um subsequente desafio por esse fungo (Scheckelhoff, M. e Deepe, G.S. Jr., The protective immune response to heat shock protein 60 of *H. capsulatum* is mediated by a subset of V 8.1/8. 2+ T cells. *Journal of Immunology*, 169:5818-5826, 2002).

Para manter a homeostasia celular sob condições fisiológicas e estresse, algumas HSPs têm sido empregadas como adjuvantes em vacinas para câncer e doenças infecciosas. Os membros das famílias HSP70 e HSP60 são os principais alvos de constituições medicamentosas para a produção de anticorpos em muitas infecções por helmintos, protozoários e bactérias.

Segundo Lussow e colaboradores (Lussow, A. R. e col., Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. *European Journal of Immunology*, 21:2297-2302, 1991) a HSP micobacteriana de 65 KDa (GroEL-tipo) e de 70 KDa (tipo DnaK) atuam como moléculas carreadoras em animais, primados com *Mycobacterium bovis* (bacillus Calmette-Guerin, BCG), para a indução de altos e duradouros títulos de anticorpos contra o peptídeo sintético da malária (NANP)40 na ausência de adjuvantes ou estímulo prévio com BCG. O efeito da HSP70 foi dependente de célula T, sendo que nenhum anticorpo anti-peptídeo ou anti HSP70

foram induzidos em camundongos atímicos (nú/nú). As HSP65 e HSP70 apresentaram função também carreadora para oligossacarídeos de meningococo do grupo C na ausência de adjuvantes. Estes dados indicam ser bastante promissora a possibilidade de uso dessas HSPs para indução de anticorpos no desenho e vacinas para uso em humanos (Barrios, C. e col., Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. II: The Use of the 70KDa mycobacterial Heat-shock proteins as carrier for conjugated vaccines can circumvent the need for adjuvants and Bacillus Calmette Guerin priming. *European Journal of Immunology*, 22:1365-1372, 1992).

Vários pedidos de patentes depositados no Brasil ou patentes concedidas no exterior, e mesmo notificações internacionais, mostram que diversas formulações medicamentosas contendo HSPs, naturais ou recombinantes, atuam como imunomoduladores para diferentes enfermidades: doenças inflamatórias (PI9907228); câncer (WO03/090687, WO02/32923, CN1522762, US20016328957, WO99/07860, US2003082136 e US6734173); doenças infecciosas (WO02/062959 e CN1737147). Formulações contendo HSPs suprimem a replicação do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida e do vírus da imunodeficiência símia (WO01/45738, US6900035, US6524825 e WO98/23735); e ainda formam complexos com peptídeos imunogênicos induzindo resposta peptídeo específica aumentada (WO97/06821, US6773707 e US6605464); além de atuarem em doenças autoimunes (US6007821 e EP262710) e diabetes (W90/10449). Outro aspecto importante envolvendo formulações contendo HSPs é descrito na patente americana US5993803, relatando que quando HSP60, ou peptídeos e/ou seus análogos são administrados em pacientes antes do transplante de órgãos ou tecidos, a autoimunidade à HSP60 é modulada, resultando em prevenção ou supressão da rejeição do órgão ou tecido.

As HSPs também podem ser empregadas em métodos e composições medicamentosas para tratamento de distúrbios vasculares em mamíferos. Um dos procedimentos consiste na administração dessas composições contendo um ou mais agentes do grupo de HSP, um fragmento ou análogo terapêuticamente efetivo de HSP em uma forma adequada para administração na mucosa. Normalmente, as proteínas usadas são a HSP65 micobacteriana, a HSP60 humana ou a HSP60 de *Clamídea*. Tal método pode também ser usado para tratar a aterosclerose, conforme descrito na patente americana US6812205.

Na última década, os avanços na tecnologia de desenvolvimento de vacinas permitiram a introdução de novas técnicas para a obtenção e produção de antígenos. Novas formas de administração e apresentação de antígenos para as células do sistema imune vêm sendo desenvolvidas pela técnica, sendo uma das mais promissoras, as vacinas de ácido desoxirribonucléico (DNA).

As vacinas de DNA consistem de um DNA plasmidial codificando uma proteína antigênica ou imunomoduladora, como as HSPs, clonado em um plasmídeo bacteriano (molécula de DNA circular que se replica separadamente do cromossomo bacteriano) e que apresenta grande potencial como agentes profiláticos e/ou terapêuticos.

A imunização com vacina de DNA resulta na transfecção de células do hospedeiro com conseqüente produção endógena do antígeno. Essa vacinação pode ser realizada em várias espécies de animais, por diversas vias e esquemas de administração. Além da injeção intramuscular que é a via mais utilizada, as vacinas gênicas também podem ser usadas por via intranasal, na forma de aerossol, por via oral ou por via intradérmica, através do bombardeamento de micropartículas de ouro recobertas com o material genético (Lima, K. M. e col., Comparison of different delivery systems of vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice. *Vaccine*, 19:3518-3525, 2001; Lima, K. M. e col., Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene Therapy*, 10:678-685, 2003).

As Vacinas de DNA têm representado uma nova abordagem para imunoprofilaxia de doenças. Após injeção intramuscular de um vetor plasmidial, o DNA é capturado pelas células musculares permitindo expressão do antígeno codificado. Após injeção única ou doses múltiplas de DNA uma resposta imune celular e humoral é desencadeada e linfócitos de memória são induzidos.

As Vacinas de DNA carreando genes das HSPs são capazes de induzir imunidade humoral e celular e exibir atividade imunomoduladora pela indução de liberação de mediadores imunológicos como as citocinas e quimiocinas. Uma vantagem adicional das vacinas gênicas é permitir a síntese de antígenos endógenos com características estruturais muito semelhantes à molécula nativa sintetizada pelo patógeno, criando epítomos conformacionais, necessários para indução de respostas imunes mais efetivas. A imunidade adquirida persiste por longos períodos de tempo devido à constante produção do antígeno dentro da célula hospedeira e à capacidade destes estimularem linfócitos da memória imunológica. Além disso, as vacinas de DNA são de fácil manejo e estocagem, o que reduz os custos de sua distribuição (Gurunathan, S. e col., DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annual Review of Immunology*, 18: 927-974, 2000).

O pedido de patente americano US2005197306 descreve uma vacina de DNA para tratamento de doenças inflamatórias autoimunes mediadas por células T. A vacina emprega uma construção recombinante de uma seqüência de ácidos nucléicos codificando a HSP60, HSP70 ou HSP90 de mamíferos ou um fragmento ativo das mesmas.

A vacina de DNA contendo peptídeos hCG C-terminal carregados pela HSP65 induz a produção de anticorpos e inibe o crescimento de tumores em animais (Yi, H. e col., Improved efficacy of DNA vaccination against breast cancer by boosting with the repeat beta-hCG C-terminal peptide carried by mycobacterial heat-shock protein HSP65. *Vaccine*, 24:2575-2584, 2006).

Os Vetores de DNA contendo antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* rico em alanina-proli856300000028 . 256200093100 . 707000012807 . 155706739655na (Apa), e antígenos micobacterianos Hsp65 e Hsp70 combinados com BCG induziram imunidade mais forte e conferiram maior proteção que BCG isolado em tuberculose em camundongos (Ferraz, J.C. e col., A heterologous DNA priming-*Mycobacterium*

bovis BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. *Infection and Immunity*, 72:6945-6950, 2004).

Uma associação de vacina de DNA expressando HSP65 e a citocina IL-12 protegeu animais contra infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, provavelmente, pelo aumento da secreção de IFN- α pelas células T, ativação de células T proliferativas e produção de citocinas (IFN- α e IL-12) (Yoshida, S, e col., DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine*, 24:1191-1204, 2006; Kita, Y. e col., Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*, 23:2132-2135, 2005).

A patente americana US6492145 propõe que infecções micobacterianas sejam evitadas pela imunização de mamíferos, incluindo o homem, com uma vacina que emprega a tecnologia do DNA recombinante, utilizando a HSP65 de *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) como antígeno. A vacina contém uma quantidade efetiva de uma construção de DNA “nú” codificando para a HSP65 de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* ou *Mycobacterium bovis*. O DNA está ligado a um promotor capaz de expressar essa seqüência em células de hospedeiros mamíferos resultando em resposta imunogênica. A diferença apresentada para a presente invenção está no uso de formulação medicamentosa ou vacinal capaz de controlar doenças causadas por fungos, não sendo restrito somente ao controle de doenças causadas por micobactérias patogênicas. Neste mesmo ponto de vista técnico, a patente PI0003132-1 descreve imunomoduladores codificando diferentes HSPs de bactérias do gênero *Mycobacterium*, principalmente as espécies *M. tuberculosis*, *M. leprae* ou *M. bovis*, incluindo uma composição farmacêutica que os contém e suas aplicações no tratamento de várias doenças, entre elas micobacterioses concomitantemente e micobacterioses atípicas.

Os imunomoduladores de interesse para o presente invento, principalmente o DNA-HSP65 de *M. Leprae*, já foram protegidos na patente PI0003132-1. Assim, o presente pedido de patente se refere a aplicação ou utilização desses imunomoduladores, preferencialmente o DNA-HSP65 de *M. Leprae* em formulações medicamentosas/vacinais para o tratamento de outros tipos de infecção, especificamente as causadas por fungos e não mais por micobactérias. Vale ressaltar que a patente PI0003132-1 não apresenta dados expandidos a nenhuma micose ou a nenhum tipo de infecção causada por fungos.

O interesse em expandir a aplicação da vacina a base desses imunomoduladores, principalmente a de DNA-HSP65 em outros modelos de infecções, como as micoses, foi a grande motivação da pesquisa que fundamenta o presente pedido de patente, quando foi demonstrado o papel imunomodular dessas construções de DNA, especialmente para tuberculose (PI0003132-1), que são doenças que acometem órgãos vitais como o pulmão. O efeito profilático e terapêutico de uma vacina ou biofármaco a base de DNA-HSP65 para o tratamento de tuberculose também foi constatado a partir de modelo murino contaminados por esta doença (Lowrie, D. B. e col., Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*, 400:269-271, 1999;

Lowrie, D. B. e col., DNA vaccines against tuberculosis. *Immunology and Cell Biology*, 75:591-594, 1997; Silva, C. L., New vaccines against tuberculosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28:843-851, 1995; e Lowrie, D. B. e col., Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine*, 12:1537-1540, 1994).

O fato de uma vacina especialmente elaborada para tratar tuberculose, ser também usada para o tratamento de Pbmicose, sugeri um mesmo mecanismo de ação para o controle de ambas as doenças. Porém, sabemos que as HSPs atuam nos organismos de maneiras diferentes, não apenas de forma direta mas também como adjuvante, percorrendo outras vias. Existem alguns indícios desses mecanismos serem diferentes, além do fato de se tratarem de patógenos distintos (tuberculose-micobactérias e micose-fungos).

Apesar do mecanismo para o controle de micoses ainda não estar totalmente elucidado, sabe-se que a proteína de choque térmico (HSP65) micobacteriana induz diferentes tipos de resposta imune dependendo da forma de administração (Lima, K.M. e col. Vaccine adjuvant: it makes the difference. *Vaccine*, 22:2374-2379, 2004) e o mecanismo de controle da infecção parece estar fortemente ligado ao tipo de patógeno (bactéria ou fungo) sobre a resposta imune dos indivíduos provocada por tais construções de DNA, sobretudo as contendo o gene da proteína de choque térmico HSP65 de micobactéria, principalmente *M. Leprae*.

A Resposta imune pode também ser desencadeada em hospedeiro vacinado com formulações contendo um antígeno de interesse ou o vetor gênico que o codifica. Uma composição na forma de microesferas de copolímeros derivados do ácido láctico e do ácido glicólico encapsulando antígenos, vetores gênicos e/ou adjuvantes estimuladores da resposta imune obtidos de frações de micobactérias foi descrita no pedido de patente brasileiro PI0103887-7. Nela, é empregado o dimicolato de trealose associado a HSP65 de *Mycobacterium leprae* ou ao plasmídeo contendo o gene que a codifica encapsulados em microesferas. Após a administração de dose única ou múltipla, essa vacina de liberação controlada induziu a secreção de citocinas implicadas na proteção de doenças infecciosas.

Também é conhecido que a resposta imune e proteção, decorrentes da ação da vacina de DNA-HSP65 são desencadeadas pela HSP65 e controladas por linfócitos T que produzem interferon-gama e são citotóxicos (Silva, C. L. e Lowrie, D. B., Enhancement of immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination. *Vaccine*, 18:1712-1716, 2000; Silva, C. L. e col., Characterization of T cells that confer a high degree of protective immunity against tuberculosis in mice after vaccination with tumor cells expressing mycobacterial hsp65. *Infection and Immunity*, 64:2400-2407, 1996). A vacinação dos animais estimulou a ativação de células do pulmão CD8⁺, IFN-gama, TNF- alfa e redução da injúria pulmonar (Bonato, V. L. e col., Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8⁺ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. *Immunology*, 113:130-138, 2004).

Camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* e que receberam o DNA-HSP65 oito semanas após a infecção apresentaram redução da população bacteriana no baço e no pulmão em comparação aos grupos controles que receberam salina, plasmídeo ou BCG. No grupo que recebeu DNA-HSP65 também se

observou um predomínio de resposta imune do tipo Th1 em relação aos outros grupos (Lowrie, D. R. e col., Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*, 400:269-271, 1999).

O mesmo agente gênico DNA-HSP65 também aumentou a atividade anti-micobacteriana da isoniazida em associação com pirazinamida e foi efetivo em prevenir a reativação da tuberculose latente (Silva, C. L. e col., Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. *Gene Therapy*, 12:281-287, 2005). Esse dado demonstra que a vacina pode ser efetiva como adjuvante ou biofármaco, durante ou após a quimioterapia para prevenir o desenvolvimento de doenças.

A administração intramuscular do DNA-HSP65 seguida pela infecção com *Mycobacterium tuberculosis*, leva a um aumento do número das células T reativas contra a HSP65. Esse aumento ocorre às custas tanto de células CD4⁺/CD8⁻ como também de células CD4⁺/CD8⁺. A imunização com DNA-HSP65 leva ainda a um aumento das células T esplênicas que expressam o fenótipo CD44^{hi}, um marcador associado a respostas do tipo Th1. As células reativas contra HSP65 provenientes de animais imunizados produzem níveis elevados de IFN- α independentemente do seu fenótipo. Por outro lado, os linfócitos de animais não vacinados respondem *in vitro* aos estímulos com HSP65 produzindo predominantemente IL-4. A administração do DNA-HSP65, oito semanas após a inoculação de bacilos da tuberculose, causa redução do número de bacilos nos tecidos e também induz desvio da resposta imune do tipo Th2 para padrão Th1 (Lowrie, D. B e col. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine*, 12:1537-1540, 1994; Lowrie, D. B e col., Protection against tuberculosis by plasmid DNA. *Vaccine*, 15: 834-838, 1997; Lowrie, D. B e col., DNA vaccines against tuberculosis. *Immunology and Cell Biology*, 75:591-594, 1997).

Um estudo recente avaliou o efeito do DNA-HSP65 na indução de artrite em linhagens de animais AIR^{min} e AIR^{max} que são espécies de animais com menor e maior tendência a desenvolver a doença. O DNA, não apenas reduziu as chances de desenvolvimento da inflamação, como também levou a regressão da artrite induzida por pristane nesses roedores (Santos-Júnior, R. R. e col., Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in an animal model of arthritis. *Human Gene Therapy*, 16:1338-1345, 2005). A mesma vacina, porém em uma versão encapsulada (microesferas de PLGA), obteve sucesso na imunização de animais infectados com *Leishmania major* (Coelho, E. A. F. e col., Parasitol Res. 2006 May; 98(6): 568-75. Epub 2006 Jan 24).

A publicação internacional WO95/25744 descreve o uso de peptídeos de HSP65 de *Mycobacterium tuberculosis* utilizados para preparação de uma composição medicamentosa para tratamento e prevenção de doenças inflamatórias incluindo doenças autoimunes, diabetes, doenças artríticas, aterosclerose, esclerose múltipla, miastenia grave ou resposta inflamatória devido a tumores ou rejeição de transplante.

Conforme consta no estado da técnica, o DNA-HSP65 promove um desvio da resposta imune frente à tuberculose, de um padrão Th2 para Th1. Esse padrão de resposta foi caracterizado em camundongos,

inclusive, por acentuadas elevações da produção de IFN- α por clones celulares específicos (Lowrie, D. B. e col. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*, 400:269-271,1999; Silva, C. L. e col., Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin, or DNA vaccination. *Immunology* 97:573-58,1999; Bonato, V. L. e col., Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Infection and Immunity*, 66:169-175,1998). Esse padrão de mudança de resposta imune de Th2 para Th1 pode ser fundamental para o tratamento de doença intersticial pulmonar (FPI). Este comportamento fundamentou a proposta da presente invenção, baseada no fato de se usar uma composição vacinal já utilizada no tratamento de tuberculose, para aplicação também no controle de micoses, principalmente a Pbmicose doença, que também acomete este órgão, por se tratar de micose do trato respiratório.

Embora o principal local de atuação desses agentes gênicos serem comuns para o tratamento de doenças causadas por micobactérias, não é esperada uma correlação direta para o tratamento de doenças causadas por microorganismos distintos. O conhecimento da técnica permite que seja mais comum esperar que o controle de doenças causadas por micobactéria se estabeleça quando as construções de DNA plasmidiais também sejam derivadas de micobactérias, confirmando o caráter inovador da presente invenção. Os resultados experimentais apresentados neste pedido de patente corroboram neste sentido, pois mostram que o mecanismo de controle da infecção apresenta características distintas, estando fortemente ligado ao tipo de patógeno (bactéria ou fungo) sobre a resposta imune dos indivíduos provocada por tais construções de DNA, sobretudo as contendo o gene da proteína de choque térmico HSP65 de micobactéria, principalmente *M. Leprae*, conforme discutido nos Exemplos 6 a 9.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

As construções plasmidiais contendo genes das proteínas de choque térmico de micobactéria, formando os imunomoduladores de interesse para a presente invenção foram descritos no pedido de patente PI0003132-1. As micobactérias envolvidas são do gênero *Mycobacterium*, principalmente as espécies *M. tuberculosis*, *M. leprae* ou *M. bovis* BCG e os imunomoduladores obtidos codificam proteínas de estresse micobacteriana de diferentes tamanhos, tais como a HSP10 (10 KDa), HSP65 (65 KDa), HSP70 (70 KDa). Tais imunomoduladores e suas variações, incluindo uma composição farmacêutica que os contém e suas aplicações no tratamento de várias de doenças causadas por micobactérias, principalmente a tuberculose, foram reivindicadas.

Portanto, o presente pedido de patente se refere ao segundo uso de medicamento, pois está baseado nos mesmos materiais genéticos e suas derivações previstas na patente mencionada anteriormente como constituinte de formulação medicamentosa/vacinal para o controle de micoses, que são doenças causadas por

fungos. Este controle envolve os processos de profilaxia (imunização), tratamento e/ou cura de infecções fúngicas, principalmente as causadas pelo gênero *Paracoccidioides*, principalmente a espécie *Paracoccidioides brasiliensis* em seres humanos e animais. Vale ressaltar que nenhuma menção ao controle de micoses foi abordada neste pedido de patente usado como referência (PI000. 3132-1).

O imunomodulador preferencial para a aplicação proposta na presente invenção, se refere à construção plasmidial expressando HSP65 de *M. Leprae*. Esse imunomodulador (DNAhsp65 de *M. Leprae* ou simplesmente DNA-HSP65) é representado pela seqüência Seq. ID Nº 1, conforme descrito na Listagem de Seqüências em anexo. Para a sua recuperação no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) – busca via Pubmed, o código de acesso é: gi | 149923 | gb | M14341.1 | MSGANTM [149923], correspondendo a M14341 (GI: 149923 para *M. leprae* 65 kd antigen).

Os demais imunomoduladores que também apresentam atividade imunogênica nos tecidos pulmonares foram igualmente protegidos no pedido de patente PI0003132-1. Estas construções de DNA plasmidial também podem ser usados em formulações medicamentosas/vacinais para o controle de micoses. Eles estão listados na **Tabela 1**, juntamente com os códigos de acesso no NCBI e de sequenciamento na Listagem em anexo.

A presente invenção relata sobre formulações medicamentosas contendo tais imunomoduladores, para a imunização e tratamento de micoses, exemplificada pelo controle de Pbmicose, principalmente para um biofármaco a base de DNA-HSP65 de *M. leprae*. Este modelo de micose foi desenvolvido em camundongos Balb/c.

TABELA 1

Imunomodulador plasmidial	Código de seqüência	Acesso
DNA-HSP65 de <i>M. leprae</i>	Seq.ID Nº 1	gi 149923 gb M14341.1 MSGANTM [149923]
DNA-HSP10 de <i>M. avium</i>	Seq.ID Nº 2	gi 41409799 ref NP_962635.1 [41409799]
DNA-HSP70 de <i>M. tuberculosis</i>	Seq.ID Nº 3	gi 15607492 ref NP_214865.1 [15607492]
MPT70 de <i>M. tuberculosis</i>	Seq.ID Nº 4	gi 531029 dbj BAA07184.1 [531029]

Para avaliação do efeito imunogênico e terapêutico foram realizadas análises histopatológicas, quantificação fúngica pulmonar nos animais infectados, dosagens de citocinas Interferon-gama (IFN- γ), fator de

necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-10, IL-12 e IL-4 e avaliação do conteúdo de anticorpos específicos para este modelo de infecção/tratamento. Os dados foram comparados com os resultados obtidos nas mesmas condições para grupo de animais normais e tratados com apenas o vetor plasmidial vazio. Ressaltando que imunomodulador usado (Seq. ID N^o 1) apresenta os resultados experimentais para a construção plasmidial pVAX1-*hsp65* de *M. Leprae*.

A invenção poderá ser melhor compreendida através da seguinte descrição detalhada mediante os Exemplos de 1 a 9 para os resultados experimentais obtidos, os quais são apresentados nas Figuras de 1 a 8, as quais são apresentadas a seguir, juntamente com o significado de alguns termos relevantes. Os procedimentos experimentais envolvidos estão detalhados em cada um dos Exemplos.

A **Figura 1** representa o esquema terapêutico apresentado para reproduzir a Pbmicose. Foram usados 40 camundongos Balb/c, divididos em quatro grupos experimentais de 10 indivíduos cada: Normais, SACAROSE, pVAX1 e pVAX1-*hsp65* de *M. leprae*. Todos os experimentos foram repetidos três vezes, de forma independente, utilizando diferentes lotes do plasmídeo e de animais. A análise da variância (ANOVA) e o método de Dunnet foram realizados pelo programa estatístico *GraphPad Prism* versão 3.0, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA.

A **Figura 2** representa a carga fúngica pulmonar recuperada de animais infectados com *P. brasiliensis* (3×10^7 células) e tratados com 4 doses de Sacarose ou pVAX1 ou pVAX1-*hsp65*. O intervalo entre as doses foi de 15 dias. O resultado foi expresso unidades formadoras de colônias/grama de tecido pulmonar. A presença do * indica o desvio padrão ($p < 0,01$).

A **Figura 3** corresponde a imagens em microscópio óptico de amostras de tecido pulmonar com 5mm de espessura e previamente tratados e corados por hematoxilina-eosina (HE), para os seguintes grupos experimentais: **(A) e (B)** animal infectado com *P. brasiliensis* e tratado com 4 doses da formulação contendo o vetor vazio (pVAX1); **(C) e (D)** animal infectado com *P. brasiliensis* e tratado com 4 doses da formulação contendo o biofármaco pVAX1-*hsp65*. As setas indicam: **(1)** a presença de granuloma epitelióide; e **(2)** um agregado linfocitário com menor número de leveduras, sem presença de granuloma epitelióide. A imagem foi aumentada 20x em (A) e (C); e 40x em (B) e (D).

A **Figura 4** mostra a dosagem de citocinas padrão Th1 pelo método de ELISA em pg/ml para os quatro grupos experimentais utilizados, correspondendo a: **(A)** TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa), **(B)** IFN gama (Interferon gama) e **(C)** IL-12 (interleucina 12). A presença do * indica o desvio padrão ($p < 0,01$).

A **Figura 5** corresponde aos gráficos da quantidade de citocinas padrão Th2 em pg/ml para os quatro grupos experimentais analisados, correspondendo a: **(A)** IL-4 (interleucina 4) e **(B)** IL-10 (interleucina 10).

A **Figura 6** representa a análise da capacidade de proliferação de esplenócitos (células do baço) dos 4 grupos experimentais na presença ou ausência de estímulos como: meio de cultura (RPM), Concanavalina A (ConA) e phitohemaglutinina (PHIT). Animais normais são aqueles que não foram infectados com *P. brasiliensis* nem tratados com nenhuma formulação. Os animais infectados com *P. brasiliensis* foram tratados com sacarose ou com o vetor vazio (pVAX1) ou com o biofármaco pVAX1-hsp65. A presença do * indica o desvio padrão ($p < 0,01$).

A **Figura 7** representa a dosagem de NO_2^- e NO_3^- para os quatro grupos experimentais analisados (Normais, Sacarose, pVAX1 e pVAX1-hsp65), sendo: **(A)** dosagem de NO_3^- e **(B)** dosagem de NO_2^- . Os resultados foram expressos em α M. A presença do * indica o desvio padrão ($p < 0,01$).

A **Figura 8** corresponde a dosagem de imunoglobulinas (IgG1 e IgG2a) para os quatro grupos experimentais analisados (normais, sacarose, pVAX1 e pVAX1-hsp65). A leitura foi realizada com absorbância em 492 nm. A presença do * indica o desvio padrão ($p < 0,01$).

O termo “biofármaco” usado nessa invenção se refere a uma formulação medicamentosa/vacinal que contém a composição plasmidial de DNA capaz de apresentar atividade imunogênica (prevenção/imunização) e imunoterapêutica (tratamento) de micoses. Um plasmídeo normalmente contém um gene e outros elementos responsáveis pela expressão do produto desse gene.

O termo “citocina” tem o mesmo significado que normalmente é empregado no estado da arte, ou seja, se refere a um sinal ou mediador químico intra ou intercelular.

O termo “maior produção de uma ou mais citocinas” se refere ao aumento da produção de uma ou mais citocinas por uma célula quando em contato com a proteína de choque térmico HSP expressa pelo respectivo DNA. O aumento da produção de uma ou mais citocinas pode ser o resultado da maior expressão de genes codificando quimiocina, ou talvez o resultado da liberação de quimiocinas da célula.

As diferentes formulações medicamentosas aplicadas às mais diversas modalidades terapêuticas para a Pbmicose disponíveis atualmente apresentam vantagens tais como o amplo espectro antifúngico e os raros episódios de resistência (anfotericina B). Porém, os efeitos colaterais e toxicológicos são freqüentes e os pacientes são submetidos a longos períodos de tratamento o que leva a desistência e possíveis recidivas das micoses (tratamentos convencionais).

A presente invenção representa uma alternativa de controle desse tipo de doença bastante promissora, pois abrange a prevenção, tratamento e/ou cura de forma segura e mais eficaz que os resultados alcançados pelo uso das formulações medicamentosas utilizadas nos tratamentos convencionais. Os objetivos da presente invenção foram atingidos de forma bastante satisfatória, já que os imunomoduladores utilizados (correspondendo a Seq. ID Nº 1, com resultados testados para pVAX1-hsp65 de *M. leprae*) e outros imunomoduladores conforme descritos anteriormente (representados pelas seqüências de Seq. ID Nº 2 a Seq. ID

Nº 4) apresentam propriedades imunogênicas e imunoterapêuticas contra a infecção e/ou doença já estabelecida, sendo estáveis em formulações medicamentosas, principalmente vacinas. Além disso, o biofármaco também pode ser utilizado para o controle de outras micoses, tornando ampliada a sua aplicabilidade para o preparo de inúmeras formulações para o tratamento de um número significativo de pacientes com infecções fúngicas.

A presente invenção representa a primeira utilização desses imunomoduladores, principalmente o representado pela seqüência Seq.ID Nº 1, em doenças fúngicas, como terapia gênica com grande eficiência, especialmente para Pbmicose. A utilização das formulações propostas apresenta ainda outras vantagens, pois controlam:

- o estabelecimento da doença causada pelo *Pb*, principalmente aquelas contendo o imunomodulador descrito na seqüência Seq. ID Nº 1;

- além dos casos que apresentam a forma crônica unifocal, controla a sua forma crônica multifocal e também disseminada desse tipo de infecção;

- a carga fúngica sobrevivente no organismo quando os indivíduos com Pbmicose não são adequadamente tratados e evita-se uma possível recidiva futura;

Além disso, a utilização das formulações propostas, principalmente as contendo o imunomodulador representado pela seqüência Seq. ID Nº 1, atuam no processo que previne a reativação da doença quando o hospedeiro contendo formas latentes do fungo apresenta um estado transitório ou não de imunodepressão.

Os benefícios práticos e estratégicos da utilização dos imunomoduladores utilizados nesta invenção, em formulações medicamentosas para o tratamento de doenças fúngicas são inúmeros: são seguros e eficazes; estimulam amplamente a resposta imunológica; possuem efeito protetor e podem contribuir significativamente para a diminuição da incidência e mesmo erradicação da Pbmicose; o custo de produção em larga escala é relativamente baixo e consiste em uma imunoterapia estável à temperatura ambiente.

Todos os fatores acima mencionados facilitam o transporte e a distribuição de programas terapêuticos em regiões de difícil acesso/áreas rurais e absolutamente desejáveis no âmbito da realidade brasileira. Além disso, a imunidade adquirida pelo tratamento com a vacina de DNA persiste por longo período de tempo, devido tanto a constante produção do antígeno dentro da célula hospedeira como a capacidade destes estimularem linfócitos de memória imunológica e, com isso, sendo desnecessárias as re-vacinações (Silva, C. L., *et al*, *Immunology* 97:573-581,1999).

Com o objetivo de comprovar o efeito no tratamento de doenças fúngicas proposto na presente invenção, foram realizados testes investigativos sobre o controle da Pbmicose (usada como doença modelo). Esta doença foi experimentalmente desencadeada em animais inoculados com fungo específico e posteriormente tratados com o DNA-HSP65 (representado pela seqüência Seq. ID Nº 1 e ilustrado pelos resultados de pVAX1-hsp65) e vários parâmetros foram avaliados para certificação do efeito. Os exemplos

abaixo têm por objetivo melhor elucidar e ilustrar a presente invenção, não devendo servir para efeitos limitativos do escopo da mesma.

EXEMPLO 1:

DNA-HSP65 – PREPARO DO PLASMÍDEO

Bactérias *Escherichia coli* DH5 α transformadas com o vetor gênico pVAX1 e com o plasmídeo contendo o gene da HSP65 (pVAX1-hps65) foram cultivadas em meio de cultura Lúria Bertani (LB BROTH Base - GIBCO BRL, Scotland) contendo kanamicina na concentração de 10 a 100 microgramas/mL. Os plasmídeos foram purificados utilizando resinas de troca iônica e de afinidade. A quantificação dos plasmídeos foi feita por espectrofotometria a 260 e 280 nm.

EXEMPLO 2:

PRODUÇÃO DO BIOFÁRMACO DNA-HSP65

O DNA-HSP65 foi obtido a partir da clonagem do gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa (HSP65) de *Mycobacterium leprae*, em plasmídeo pVAX1 (Invitrogen). Para tanto foram empregados plasmídeos que expressam o promotor do gene precoce imediato do citomegalovirus (CMV), ou outro originário da hidroximetilglutaril-coenzima-A redutase murina (HMG), com resultados semelhantes.

Os plasmídeos clonados foram usados como vacina e obtidos a partir de crescimento em bactérias *Escherichia coli* incubadas em meio de cultura Luria Bertani (DIFCO) contendo kanamicina (Cilnon TM) por 8 horas, a 37 α C, sob agitação a 250 rpm. Após o crescimento, a suspensão de cultura bacteriana foi centrifugada e os plasmídeos purificados com sistemas de purificação da marca QIAGEN, conforme especificações do fabricante.

Outras variações incluem a maneira geral de produção desses imunomoduladores descritos na patente PI0003132-1, referentes a construções de ácidos nucleicos compreendendo uma seqüência codificadora, operacionalmente ligadas a um promotor capaz de expressar tais seqüências codificadoras em células de hospedeiros mamíferos, podendo ser usados promotores do tipo CMV e HMG. Além disso, o gene de expressão da proteína de choque térmico de diferentes tamanhos pode se originar de diferentes fontes, sendo de origem bacteriana, de mamíferos ou micobacteriana, principalmente as HSP10, HSP65 e HSP70, preferencialmente a HSP65.

EXEMPLO 3:

TRATAMENTO DOS ANIMAIS INFECTADOS COM *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb)

Compreende o controle da infecção e/ou doença causada por fungos, especialmente o *Pb*, através da administração no hospedeiro de uma quantidade efetiva do agente terapêutico gênico plasmidial. Para avaliar a atividade imunoterapêutica do produto (agente terapêutico gênico plasmidial anteriormente citado) foram

conduzidos experimentos murinos obedecendo as normas do Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

Para reproduzir a doença, camundongos Balb/c foram submetidos aos ensaios divididos em quatro grupos experimentais :

- 1) Dez animais normais, grupo de animais que não foram infectados com *Pb* e nem tratados (Grupo NORMAIS);
- 2) Dez animais infectados com *Pb* e tratados apenas com sacarose 0,9% (Grupo SACAROSE);
- 3) Dez animais infectados com *Pb* e tratados apenas com formulação vacinal contendo apenas o vetor plasmidial vazio (pVAX1) sem o inserto do gene da proteína de choque térmico hsp65 de *M leprae* (GRUPO pVAX1);
- 4) Dez animais infectados com *Pb* e tratados com a formulação vacinal contendo a construção plasmidial pVAX1-hsp65 de *M leprae* (GRUPO pVAX1-hsp65).

A infecção dos camundongos foi realizada com o fungo *Pb*, isolado Pb18, obtido no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília. Este isolado foi cultivado em meio de cultura YPD (yeast extract 10g, dextrose 20g, peptona bacteriológica 20g, água destilada qsp1litro) líquido a 36°C em *shaker* rotatório (220 rpm). Após 5 dias de cultivo todo o meio foi centrifugado a 1000 rpm durante cinco minutos. O sedimento de células foi ressuspensão em PBS estéril (pH 7.4) e as células foram contadas. A viabilidade celular foi determinada pelo corante Verde–Janus. Cada animal foi anestesiado com éter e inoculado com 100µL por via endovenosa (retro orbital) de uma suspensão de células na concentração de 3×10^7 células viáveis/mL. Após 60 dias de infecção, os camundongos receberam quatro doses de 100 µg total de plasmídeo contendo o gene que codifica a proteína hsp65 do *M. leprae* por via intramuscular (IM), nas duas coxas traseiras (50 µg de DNA por coxa) em intervalos de 15 dias entre cada aplicação. A construção plasmidial foi diluída em solução de sacarose 0,9%, usando água destilada autoclavada, na proporção de 1:1, ou seja, para cada animal foi feita uma administração (injeção) de 100 µL de solução de sacarose, contendo 100 µg de DNA dividida em duas aplicações, nas duas coxas traseiras. Após 15 dias da última aplicação os camundongos foram sacrificados e a evolução da doença e o padrão de resposta imune gerada foi analisado. O esquema imunoterapêutico utilizado está mostrado na **Figura 1**.

EXEMPLO 4:

REDUÇÃO DA CARGA FÚNGICA PULMONAR DOS ANIMAIS INFECTADOS COM *Pb* E TRATADOS COM DNA-HSP65

Fragmentos de pulmão dos camundongos foram retirados, pesados e divulsionados em 1 mL de salina tamponada estéril. Cem microlitros deste macerado foram semeados em placas de vidro contendo meio BHI-ágar (*Brain-Heart-Infusion*,) enriquecido com 5 % (v/v pVAX1) de soro de cavalo, dextrose e 5 % (v/v) de

filtrado de cultura de *Pb* 192 cultivado por 7 dias, necessários para o crescimento clonal do *Pb*. As placas foram incubadas a 37 °C por até 20 dias, quando então foram contadas as unidades formadoras de colônia (UFCs). Os resultados foram expressos em UFC/g de pulmão. As diferenças entre as médias dos números de UFCs entre os grupos experimentais foram analisadas pelos teste estatístico ANOVA seguido do método *Dunnet (pós teste)*. O programa utilizado para estas análises foi o Graphpad Prism versão 3.0, Graphpad Software, San Diego, Califórnia, USA.

Conforme indicam os resultados apresentados na **Figura 2**, os animais que foram tratados com a construção plasmidial pVAX1-hsp65 da *M. leprae* apresentaram diferenças significativas em relação à recuperação fúngica do macerado pulmonar quando comparados aos grupos dos animais normais (sem infecção e sem tratamento), dos animais tratados apenas com sacarose (grupo sacarose) e dos animais tratados com o vetor vazio sem o inserto gênico da hsp65 de *M. leprae*. Os animais que não receberam tratamento apresentaram maior quantidade de UFCs nos pulmões. A recuperação celular de fungos dos tecidos é um parâmetro importante para determinar a eficiência de uma terapia antifúngica (Nishikaku&Burger, Blankophor. J. Evaluation of fungal burden in experimental *paracoccidioidomycosis* by using the fluorescent dye Blankophor. *Clin Microbiol.* 2003 41(7):3419-22). A formulação vacinal contendo a construção plasmidial pVAX1-hsp65 mostrou-se eficiente na recuperação fúngica pulmonar visto que houve diferença significativa, cerca de 50% de redução fúngica pulmonar, entre o grupo tratado com a construção pVAX1-hsp65 e os animais infectados e tratados apenas com a solução de sacarose 0,9% (grupo sacarose) e os animais infectados e tratados com o vetor de expressão vazio sem o inserto gênico (grupo pVAX1).

EXEMPLO 5:

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA PULMONAR DE ANIMAIS INFECTADOS COM *Pb* E TRATADOS COM DNA-HSP65

Os animais infectados com *Pb* foram sacrificados e fragmentos de seus pulmões foram retirados e fixados em formol (10%). Após fixação por período máximo de 8 horas, os fragmentos foram mantidos em álcool 70% (diluído com água destilada) e incluídos em parafina. Cortes de 5 mm de espessura foram corados por hematoxilina-eosina (HE) e examinados em microscópio óptico.

Os resultados obtidos confirmam a ação antifúngica proposta na presente invenção e concomitante atividade terapêutica da construção plasmidial pVAX1-hsp65.

As **Figuras 3A e 3B** apresentam superfícies pulmonares com granuloma epitelióide envolvendo grande quantidade de leveduras de animais infectados com *Pb* (indicado em (1)) e tratados com o vetor de expressão vazio, sem o inserto gênico (grupo experimental pVAX1), respectivamente.

As **Figuras 3C e 3D** apresentam um agregado linfocitário envolvendo algumas leveduras (indicado em (2)), sem presença de granuloma epitelióide. Esse grupo experimental (tratado com a formulação

vacinal contendo a construção plasmidial pVAX1-hsp65) apresentou redução do número de levedura nos cortes de tecido pulmonar, confirmando o efeito protetor do tratamento para Pbmicose. Os resultados positivos para essa doença fúngica-modelo são expandidas a outras doenças causadas por fungos.

EXEMPLO 6:

AUMENTO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS DE PADRÃO TH1 NOS ANIMAIS TRATADOS COM O BIOFÁRMACO DNA-HSP65

Um aumento significativo na produção de citocinas de padrão Th1 induzida pela terapia gênica é responsável pelo efeito benéfico em camundongos infectados com *Pb*. As citocinas produzidas pelos macrófagos e neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos foram dosadas pelo método de ELISA. Foram utilizados kits comerciais padronizados para cada grupo de citocinas (BD Biosciences San Diego CA).

Os dados da **Figura 4** mostram que os animais previamente infectados com *Pb* e tratados com a formulação vacinal contendo a construção plasmidial pVAX1-hsp65 induziu a secreção de citocinas de padrão Th1 (TNF- α , IFN- γ e IL-12), criando um ambiente favorável à erradicação do *Pb*. Os resultados da **Figura 5** mostram que não houve aumento significativo na secreção de citocinas de padrão Th2 (IL-04 e IL-10).

No tratamento para Pbmicose com o biofármaco contendo o DNA-HSP65 está aumentada a liberação de IFN-g, TNF-a e IL-12 (que são consideradas citocinas estimulatórias da resposta imune celular), mas não de IL-4 e IL-10 que são supressoras dessa resposta). Portanto, o padrão de resposta imunológica induzida nos camundongos, pelo tratamento com o gene hsp65, foi considerado do tipo Th1, o qual é altamente favorável para a eliminação de agentes infecciosos.

Tanto para tuberculose quanto para Pbmicose o padrão de citocinas Th1 é um padrão ligado a proteção do hospedeiro, ou seja, havendo uma maior secreção dessas citocinas após o tratamento. Com o tratamento por meio da vacina de DNA-HSP65 é provável que o organismo consiga combater a infecção, reduzindo ou até curando a doença. Isto está de acordo com os resultados mostrados na **Figura 4**, onde foi observado um aumento significativo na produção de IFN gama nos animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com o biofármaco (DNA-HSP65, representado pelos resultados de pVAX1-hsp65) em comparação com os animais normais (níveis basais da citocina), animais infectados e tratados com apenas a sacarose e o vetor vazio (pVAX1). Mesmo havendo acréscimo significativo, os níveis de IFN- gama estão mais baixos quando comparados com os dados encontrados para animais imunizados e tratados com o mesmo biofármaco e infectados com *M. tuberculosis* (patente PI003132). Portanto, esse aumento de IFN- gama é mais acentuado para tuberculose. Embora haja proteção conferida aos animais infectados com *P. Brasiliensis*, como mostram os dados da presente invenção, porém sem níveis muito altos de IFN gama.

Os mecanismos envolvidos no processo de proteção e imunomodulação gerados a partir da administração de HSPs, como a HSP65 *M. leprae*, ainda estão em fase de consolidação, sendo necessários a realização de outros estudos a fim de elucidar completamente esses processos. Na tuberculose pode estar ocorrendo de forma *predominante* o papel da HPS65 e assim é desenvolvida uma resposta imune específica baseada na estimulação de anticorpos, e linfócitos TCD4 e TCD8 específicos. Na Pbmicose pode estar ocorrendo de forma *predominante* a atividade imunoadjuvante e também a atividade chaperonina da HSP65.

EXEMPLO 7:

RECUPERAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROLIFERAÇÃO DE ESPLÊNOCITOS TOTAIS DE ANIMAIS INFECTADOS COM *Pb* E TRATADOS COM DNA-HSP65

Após o sacrifício, células do baço foram utilizadas em cultura para avaliar a proliferação celular. As células foram ressuspensas para uma concentração de 5×10^6 células/mL. As células foram colocadas em placas de 96 poços de fundo chato, em volume de 100 μ L das suspensões celulares, em triplicata. Às células foram adicionados 100 μ L de RPMI contendo o mitógeno inespecífico (Concanavalina A) ou phito- ou fitohemaglutinina (PHIT). As células foram incubadas por 60 horas a 37°C com 5% de CO₂ e 12 horas antes do término da incubação, 1 μ Ci de timidina tritiada [³H] TdR (1 mCi/mL) foi adicionada às culturas. Após este período, as células foram coletadas e a incorporação da timidina tritiada foi determinada em pela radiação liberada, medida em contador de cintilação líquida. Os resultados foram expressos em contagens por minuto (cpm) por 5×10^5 células.

Segundo os resultados apresentados na **Figura 6**, os animais dos grupos experimentais infectados com *Pb* e tratados com o sacarose 0,9% (sacarose) e o tratado com o vetor de expressão vazio, sem o inserto (pVAX1), apresentaram diminuição da capacidade de proliferação de esplenócitos totais após estimulação com Concanavalina A (ConA) e (PHIT). Diferentemente, os animais do grupo experimental pVAX1-hsp65 recuperaram, em parte, a capacidade de proliferar. Todos os grupos experimentais foram comparados com o grupo normal que corresponde aos animais que não foram nem infectados e nem tratados. Apenas o grupo infectado com *P. brasiliensis* e tratado com a construção plasmidial pVAX1-hsp65 não possuiu diferença significativa quando comparado estatisticamente. Isto significa que o tratamento da Pbmicose em camundongos pela injeção intramuscular direta de DNA-HPS65 de *M. leprae* promove recuperação da capacidade de proliferação de esplenócitos totais, não havendo diferença significativa com os animais normais (controle), que são animais saudáveis, livres de infecções. Os animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com formulações contendo sacarose ou o vetor vazio, ou seja, não contendo o biofármaco, perderam em parte a sua capacidade de proliferação celular, comum em casos de infecções e animais com padrão imunológico alterado.

EXEMPLO 8:

PRODUÇÃO DE RADICAIS REATIVOS DO NITROGÊNIO PELOS MACRÓFAGOS ATIVADOS DE ANIMAIS INFECTADOS COM *Pb* e TRATADOS COM DNA-HSP65

A diminuição da infecção experimental pelo *Pb* está relacionada com a produção de óxido nítrico (NO), quantificado pela presença de nitrito (sobrenadante de cultura de células) e nitrato (soro) (Bocca, A. L., *et col.*, Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J. Immunol.* 161:3056-3063, 1998). A produção de NO pelos macrófagos é considerada o principal mecanismo microbicida, já que os reativos intermediários do oxigênio, também produzidos pelos macrófagos ativados, não são capazes de destruir o fungo (Brummer *et al.*, *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis* *J. Immunol.*, 140-2786-2789, 1998). O NO decompõe-se espontaneamente em nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) no meio de cultura e a produção de NO_2^- pelos macrófagos pode ser dosada por ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN, L. C., *et col.*, Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat *Science*, 212.4490, 56-58, 1981).

Para dosagem foi adicionado aos sobrenadantes o mesmo volume do reagente de *Griess*, que continha NEED 0,1% (N-(1-Naphthyl) ethyl-enedinamine e sulfanilamida 1% diluída em ácido fosfórico (H_3PO_4) a 5%). A reação é revelada e parada por nitrito de sódio e as amostras foram lidas em leitor de ELISA com filtro de 450 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ de NO_2^- por 3×10^5 células após 24 h de incubação, comparando-se a D.O. do experimento com a D.O. da curva padrão de NO_2^- , que variou de 3,125 a 200,0 $\mu\text{mol/L}$, com relação ao do experimento (GREEN, L. C., *et col.*, Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat *Science*, 212.4490, 56-58, 1981).

A dosagem de NO no soro dos animais foi realizada através de redução enzimática do NO_3^- em NO_2^- pela enzima nitrato redutase. Os soros foram diluídos (1:5 em água destilada em volume) e alíquotas de 50 μL foram incubadas com o mesmo volume do tampão redutase (fosfato de potássio 0.1M, pH 7.5 contendo 1mM NADPH, 10 mM FAD e 4U nitrato redutase /mL) por 12 horas a 37° C. Os dados para construção da curva de nitrato também foram nas mesmas condições (incubação com tampão redutase). A concentração do nitrito foi determinada pela reação colorimétrica de Griess. Os resultados foram expressos em μM de NO_3^- .

As **Figuras 7A e 7B** mostram os resultados obtidos nas dosagens de NO_3^- e NO_2^- , respectivamente. O aumento significativo observado na produção de ambas as espécies do nitrogênio pelos macrófagos ativados demonstra que a infecção por *Pb* está sendo controlada, uma vez que quanto maior a concentração desses ânions, maior é a concentração de NO gerado, que neste caso é o principal responsável pela ação microbicida dos macrófagos.

EXEMPLO 9:

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS DO TIPO IGg2a

As amostras de soro de todos os grupos experimentais foram utilizadas para a dosagem dos isotipos IgG1 e IgG2A por ELISA.

Foram utilizadas placas de ELISA de 96 orifícios (Nunc) sensibilizadas com 100µL de proteína recombinante HSP65 (rhsp65 - 250 ng/100µL/orifício) por 12 h a 4°C. Após a primeira incubação, os orifícios foram bloqueados com tampão fosfato acrescido de caseína a 2% por 2 h a 37 °C. Posteriormente, os orifícios foram incubados com as amostras dos soros dos animais diluídas 1:100 por 2 h a 37 °C. Após a incubação, a placa foi lavada com tampão de lavagem (Tampão Fosfato com 0,05% tween 20) e incubada com anticorpos específicos, com peroxidase marcada, de camundongo para os isotipos IgG1 ou IgG2a (Sigma), diluídos 1:5000 por 2 h a 37 °C. As placas foram lavadas sete vezes com o tampão de lavagem e incubadas com H₂O₂ e fenilenediamina para o desenvolvimento da reação. Esta foi interrompida com 20 µL de H₂SO₄ (2N) e a leitura foi realizada em filtro de 492 nm.

Os resultados apresentados na **Figura 8** dos níveis das imunoglobulinas G em soros de animais (isótipos 1 e 2a) mostram um padrão de resposta Th1 pelo aumento da produção da IgG2a em animais tratados com a formulação vacinal contendo a construção plasmidial pVAX1-hsp65. Esses dados demonstram, mais uma vez, o efeito imunoterapêutico da presente invenção em animais infectados com *Pb*.

Apesar dos resultados positivos (protetores) em animais infectados com o fungo *P. brasiliensis* e imunizados ou tratados com a vacina DNA-HSP65, o mecanismo de ação ainda necessita de novos estudos para melhor compreensão. Sabemos que a proteína de choque térmico (HSP65) micobacteriana induz diferentes tipos de resposta imune dependendo da forma de administração (Lima, K.M. e col. Vaccine adjuvant: it makes the difference. *Vaccine*, 22:2374-2379, 2004) e o mecanismo de controle da infecção parece estar fortemente ligado ao tipo de patógeno (bactéria ou fungo) sobre a resposta imune dos indivíduos provocada por tais construções de DNA, sobretudo as contendo o gene da proteína de choque térmico HSP65 de micobactéria, principalmente *M. Leprae* (como sugerem os resultados obtidos nos Exemplos 6 e 9).

Adicionalmente, é de conhecimento que para a tuberculose a inoculação do DNA-HSP65 *M. Leprae* induz a produção da proteína HSP65 e contra a qual é desenvolvida uma resposta imune específica baseada na estimulação de anticorpos, e linfócitos T CD4 e TCD8 específicos (Silva, C. L. e Lowrie, D. B., Enhancement of immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination. *Vaccine*, 18:1712-1716, 2000; Silva, C. L. e col., Characterization of T cells that confer a high degree of protective immunity against tuberculosis in mice after vaccination with tumor cells expressing mycobacterial hsp65. *Infection and Immunity*, 64:2400-2407, 1996;

Bonato, V. L. e col., Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8⁺ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. *Immunology*, 113:130-138, 2004). A imunização com DNA-HSP65 para tuberculose ainda leva a um aumento das células T esplênicas que expressam o fenótipo CD44^{hi}, um marcador associado a respostas do tipo Th1. As células reativas contra HSP65 provenientes de animais imunizados produzem níveis elevados de IFN-γ independentemente do seu

fenótipo. Por outro lado, os linfócitos de animais não vacinados respondem *in vitro* aos estímulos com HSP65, produzindo predominantemente IL-4. A administração do DNA-HSP65, oito semanas após a inoculação de bacilos da tuberculose, causa redução do número de bacilos nos tecidos e também induz desvio da resposta imune do tipo Th2 para padrão Th1 (Lowrie, D. B. e col. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine*, 12:1537-1540, 1994; Lowrie, D. B. e col. Protection against tuberculosis by plasmid DNA. *Vaccine*, 15: 834-838, 1997; Lowrie, D. B. e col. DNA vaccines against tuberculosis. *Immunology and Cell Biology*, 75:591-594, 1997).

Além disso, as proteínas de choque térmico (HSPs) podem ter um papel adjuvante (imunoadjuvante) predominante após serem inoculadas. No caso da Pbmicoose, o modelo de doença fúngica abordado na presente invenção, o mecanismo de controle pode estar associado à participação da atividade imunoadjuvante da HSP65. Assim, após a sua síntese, a sua atividade imunoadjuvante pode estimular células APCs (macrófagos e células dendríticas via receptores *Toll Like*, entre outros) a liberar diversos mediadores imunológicos que favorecem uma resposta imune do tipo Th1 e também pela atividade chaperonina da HSP65, formando complexos HSP65-peptídeos de proteínas de patógenos, por exemplo, e favorecendo resposta imune específica para esses peptídeos carregados pela HSP65. Assim, o mecanismo efetor da vacina de DNA utilizando a HSP65 pode se dar não só de forma direta, com a atuação da proteína sintetizada dentro do organismo imunizado ou tratado com o gene dessa proteína, como também de forma adjuvante, estimulando receptores de membrana e formando complexos HSP65-peptídeos.

O efeito antifúngico apresentado pela composição medicamentosa que contém o imunomodulador apresentado nesta invenção possui fortes indícios sob a ação microbicida de óxido nítrico (NO), produzidos pelos macrófagos no controle da infecção causada por esses microorganismos. Apesar do mecanismo ainda não estar elucidado, o NO apresenta uma ação microbicida comprovadamente mais eficaz que os intermediários ativos de oxigênio (Bocca, A. L. e col., Treatment of Paracoccidioides brasiliensis-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J. Immunol.* 161:3056-3063, 1998). Isto sugere, que apesar do presente imunomodulador possuir ação para o controle de doenças causadas por micobactéria das quais são derivados (microorganismo patogênico utilizado na construção do plasmídeo primário e posterior clonagem em outro microorganismo - bactéria hospedeira), como tuberculose e hanseníase, o mecanismo de controle da infecção parece estar fortemente ligado ao tipo de patógeno (bactéria ou fungo) sobre a resposta imune dos indivíduos provocada por tais construções de DNA, sobretudo as contendo o gene da proteína de choque térmico HSP65 de micobactéria, principalmente *M. Leprae*.

Todos os resultados apresentados nos exemplos acima descritos corroboram que o objetivo da presente invenção foi atingido, mostrando a aplicação da terapia gênica para Pbmicoose, pela administração de uma construção de DNA plasmidial, principalmente por via IM e doses específicas em animais já infectados previamente com *Pb*. A vacina de DNA preveniu o desenvolvimento da doença e reduziu significativamente a

carga fúngica pulmonar (cerca de 50%), estimulando amplamente a resposta imunológica do hospedeiro. Os demais imunomoduladores plasmidiais, representados pelas seq. ID Nº 2 a 4, também foram promissores para o controle de Pb (tipo de doença fúngica-modelo). O controle da infecção pode ser atingido ainda pelo uso dessas construções de DNA plasmidiais de maneira isolada ou combinada (mistura de pelo menos dois imunomoduladores distintos) em formulações medicamentosas/vacinais destinadas ao controle de doenças causadas por fungos, tais como Candidíase, Histoplasmose, Coccidioidomicose, Blastomicose, Sporotricose, Cryptococose, Aspergilose e Paracoccidioidomicose, especialmente as provocadas pelo gênero *Paracoccidioides*, principalmente a espécie *Paracoccidioides brasiliensis*.

Portanto, os biofármacos testados para micoses ou doenças fúngicas em geral poderão ser formulados e administrados na presença de pelo menos um veículo, um diluente, um solvente, um sistema de liberação controlada e/ou excipientes farmacologicamente aceitáveis, estabilizados em fase homogênea ou heterogênea. Nos testes, foi utilizada solução de sacarose (de 0,9% preparada com água destilada autoclavada). Porém outras soluções poderão desempenhar a mesma função de diluente, sendo o biofármaco formulado e/ou veiculado não somente em formulações aquosas, mas também podendo ser usados emulsões do tipo óleo/água ou óleo/água/óleo, formando fase homogênea ou heterogênea.

De forma geral, além da presença dos aditivos listados anteriormente outros compostos antifúngicos e outros imunomoduladores ou agentes gênicos terapêuticos podem ser usados, estando a apresentação da formulação medicamentosa em conformidade com as vias de administração. As vias de administração que podem ser utilizadas são: via tópica, nasal, oral, inalação, transdérmica, retal ou parenteral. Além disso, tais biofármacos poderão ser administrados em humanos, isolado em dose única ou múltiplas doses ou em associação com outros medicamentos ou preparações imunoterapêuticas. Nos Exemplos, os dados apresentados foram baseados em 4 doses de 100 microgramas de DNA plasmidial cada, sendo no total 400 microgramas de DNA para o tratamento. A diminuição das doses poderá ser possível quando utilizado com um adjuvante em tratamentos convencionais, com drogas tradicionais. Também a utilização de sistemas de liberação controlada (como os polímeros biocompatíveis, matrizes poliméricas, cápsulas, microcápsulas, nanocápsulas, micropartículas, nanopartículas, lipossomas, lipoesferas, pós secos, e sistemas de liberação transdérmica) ou suas combinações poderão reduzir as doses utilizadas.

A dosagem efetiva vai depender, portanto, de muitos fatores, tais como do sistema carreador que está sendo utilizado, da rota de administração e do tamanho/peso do indivíduo a ser tratado. O esquema de doses também pode variar de acordo com a rota de administração, do indivíduo e a condição deste indivíduo. O tratamento da micose pode estar ou não associada a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

Vias de administração preferidas são por oral ou injeção, tipicamente intramuscular ou injeção intradérmica. Injeção do agente terapêutico no músculo esquelético ou na pele de humanos ou animais é particularmente preferida.

FIGURA 1

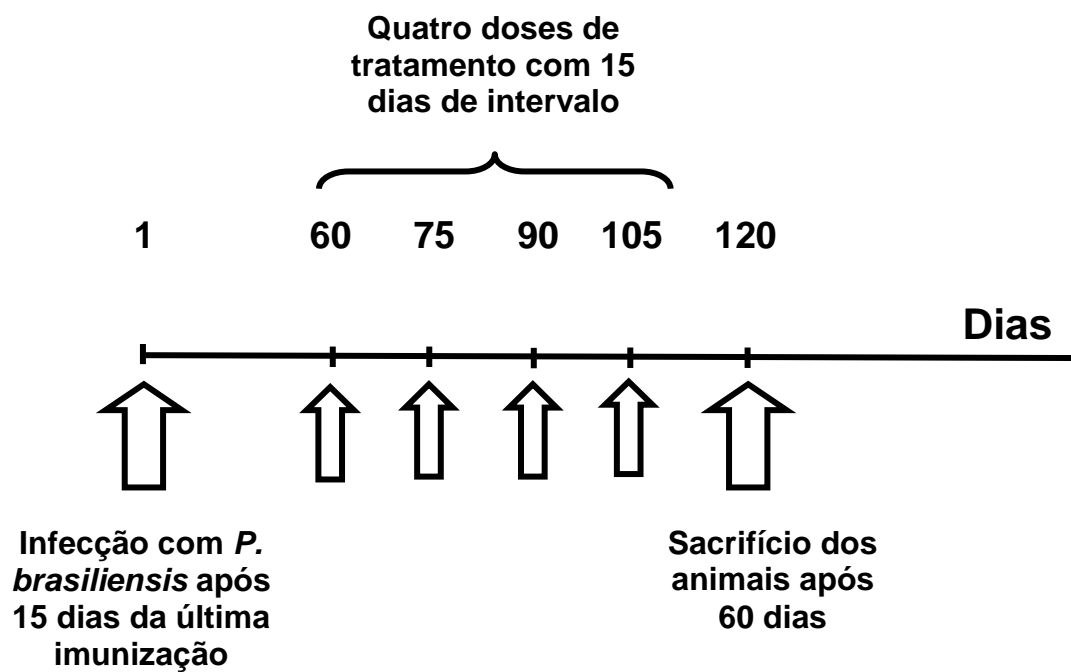


FIGURA 2

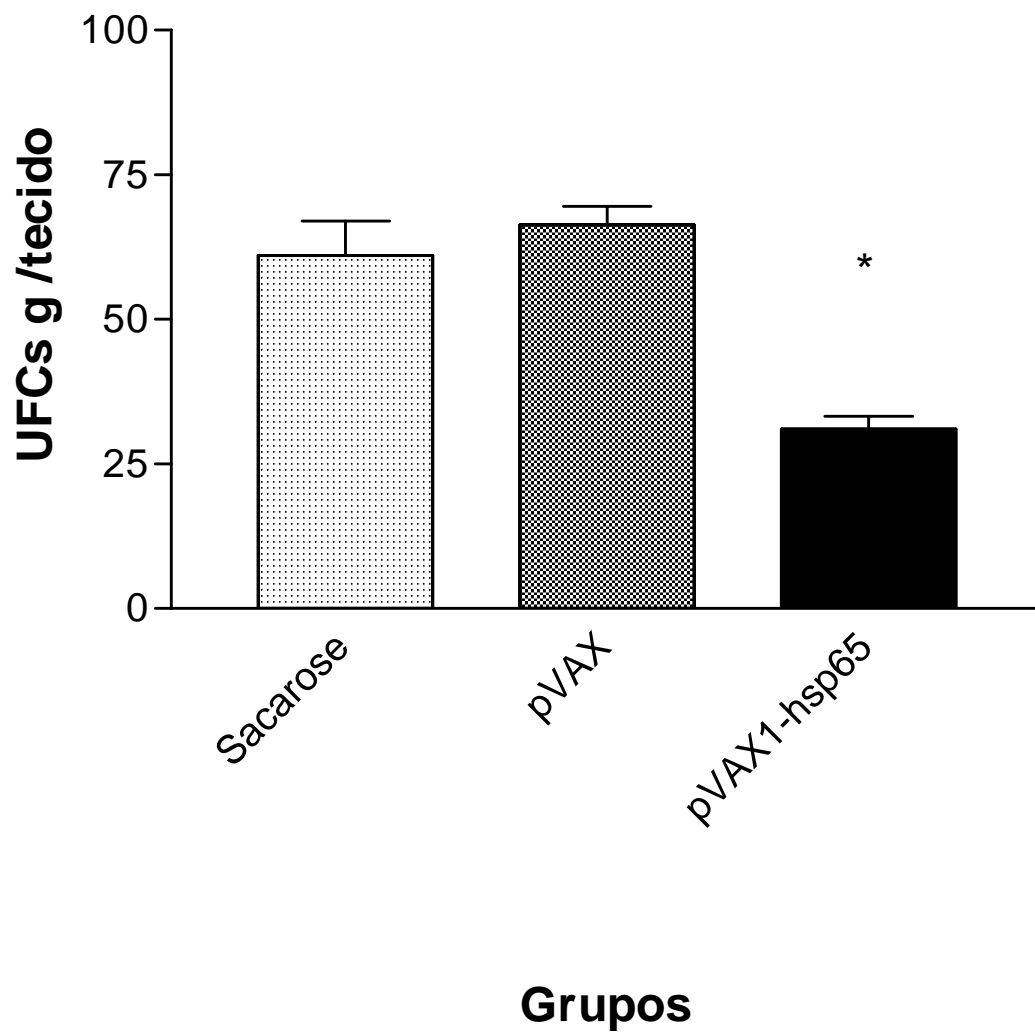


FIGURA 3

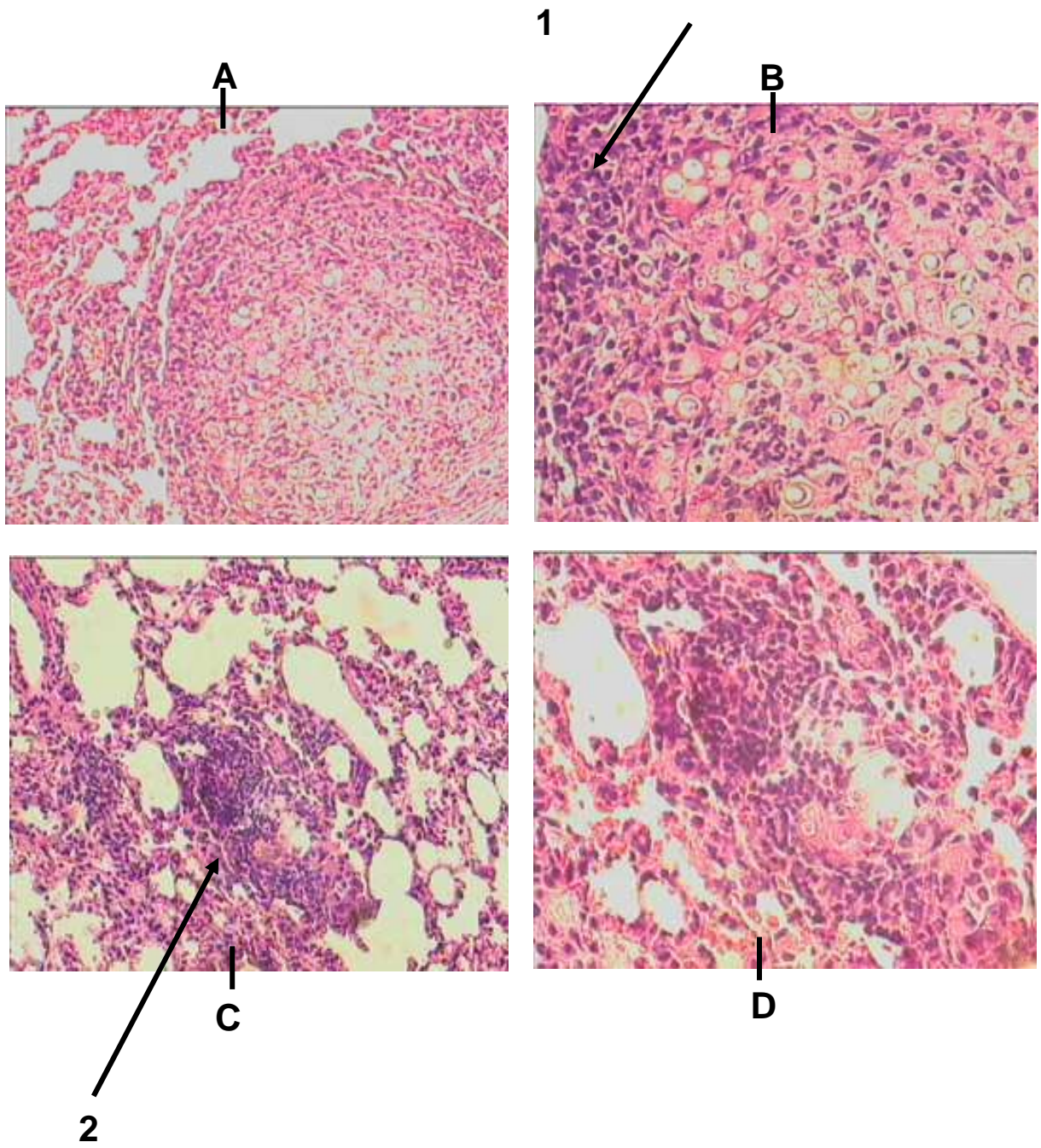


FIGURA 4

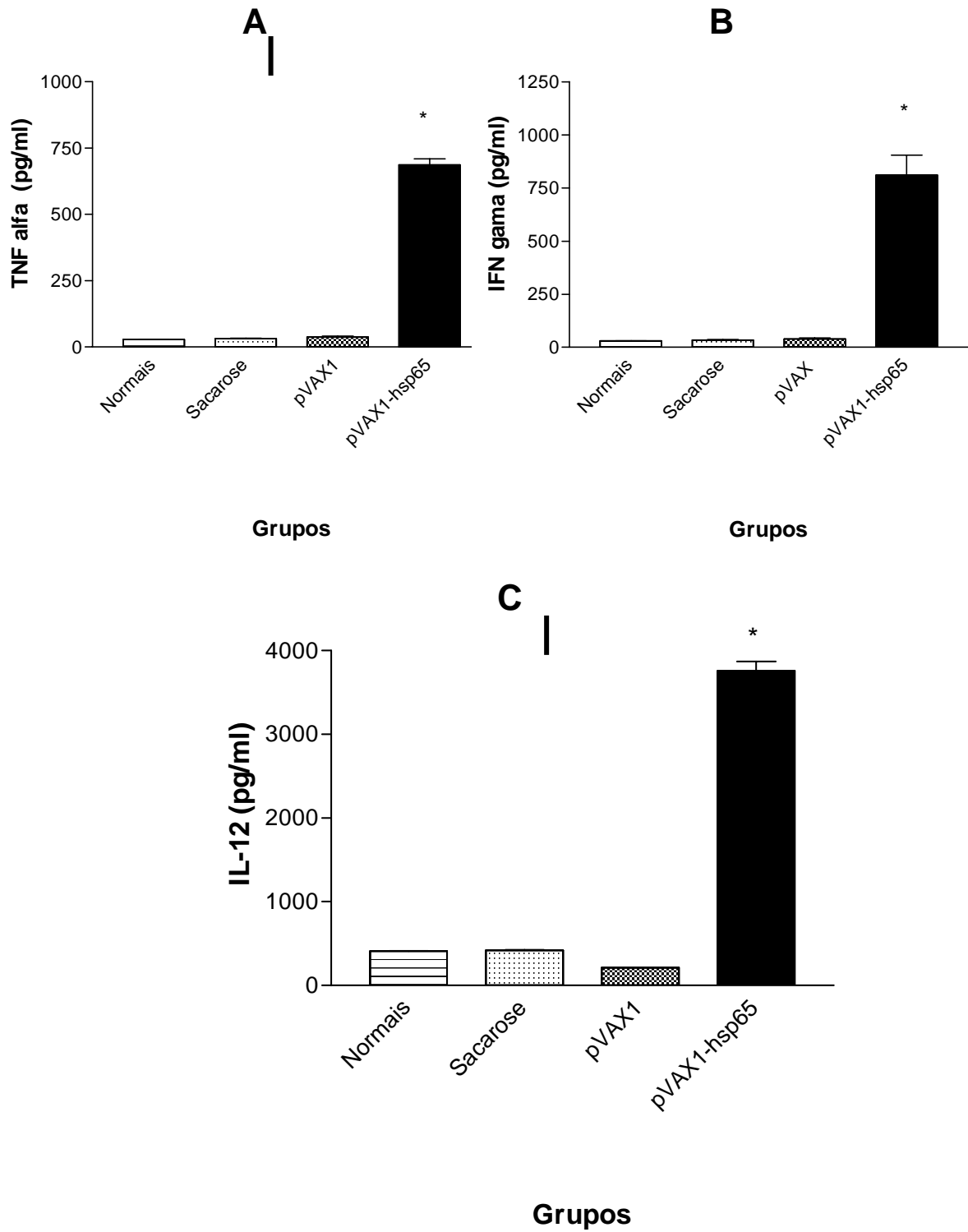


FIGURA 5

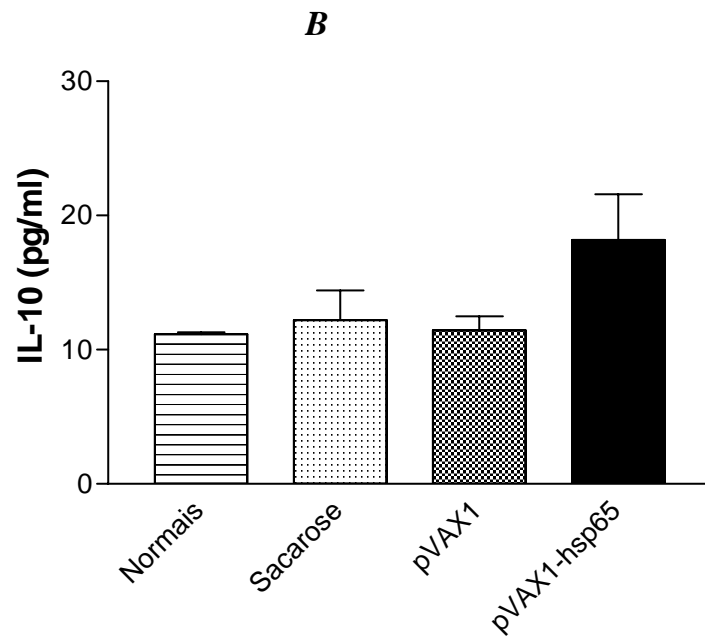
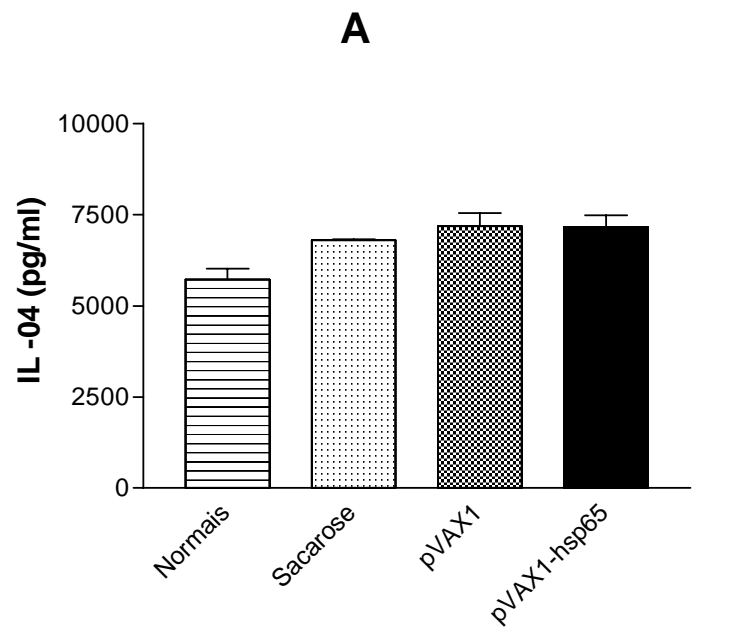
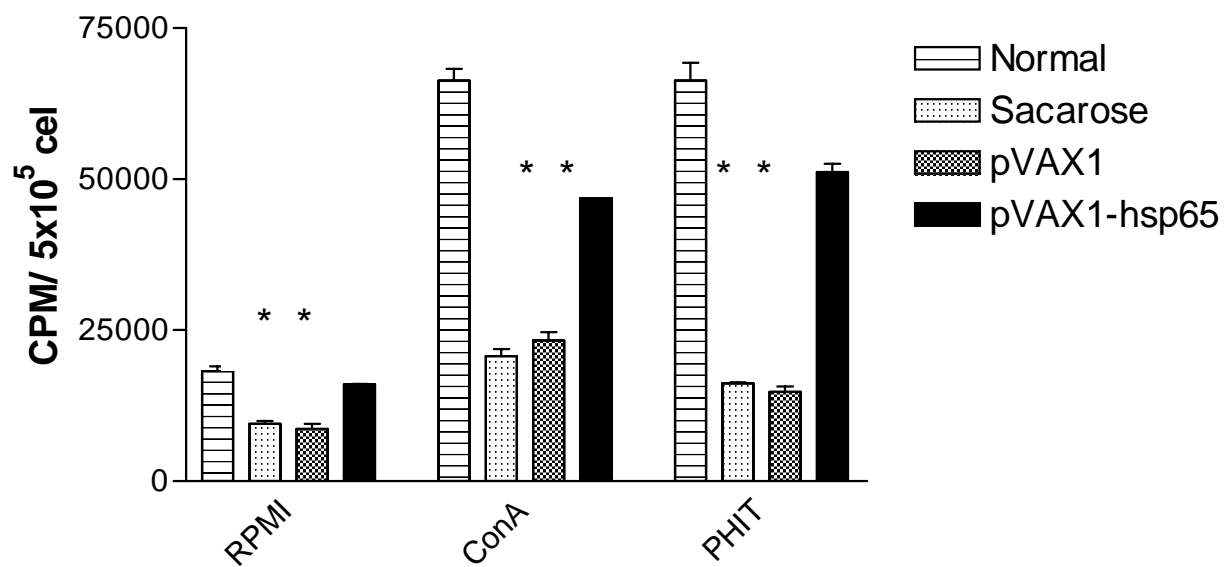
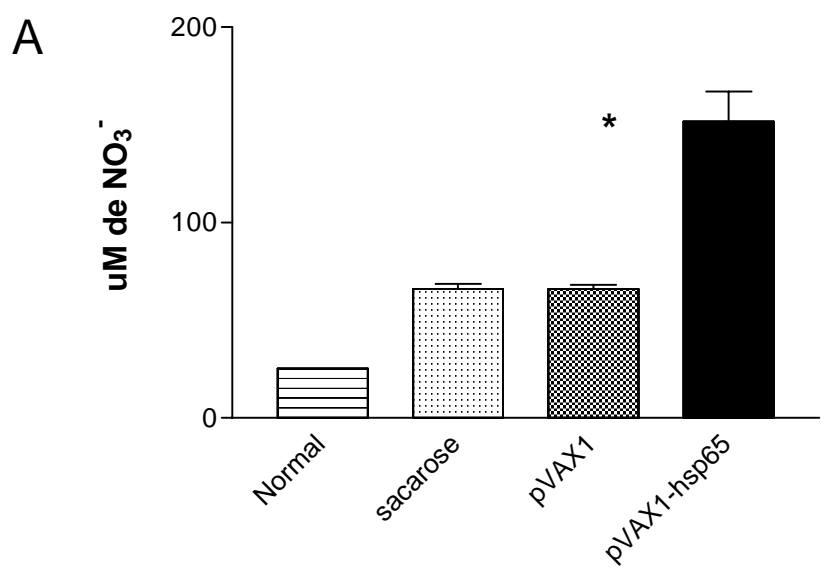


FIGURA 6

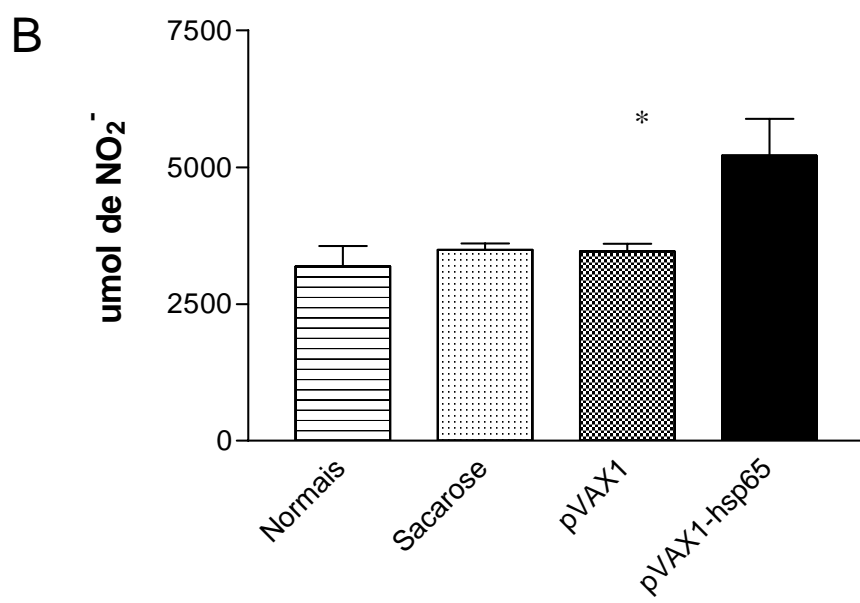


Estímulos

FIGURA 7

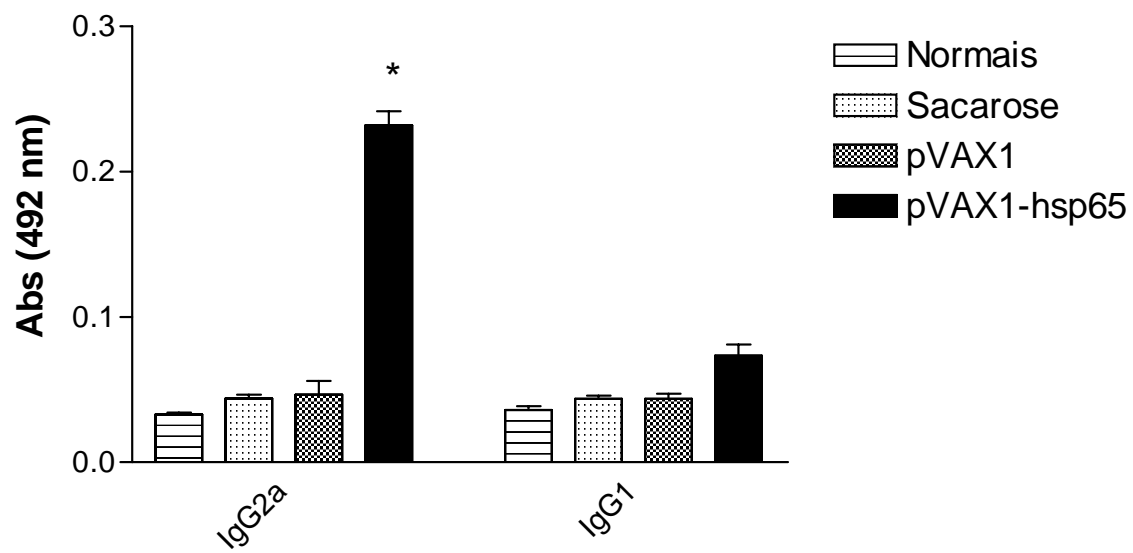


Grupos



Grupos

FIGURA 8



LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS BIOLÓGICAS

1) Informações gerais do Pedido de Patente

(i) Dados dos Requerentes:

a) **Nomes:** (1) Fundação Universidade de Brasília e (2) Farmacore Biotecnologia Ltda

b) **Endereços:** (1) Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Faculdade de Tecnologia, Módulo AT-05, Caixa Postal 04397 CEP: 70919-970, Brasília – DF e (2) Incubadora Supera, Rua dos Técnicos, s/n, Campus da USP, Ribeirão Preto-SP.

(ii) **Título da invenção:** “USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICOBACTERIANA PARA O CONTROLE DE MICOSES”

(iii) **Número de seqüências constantes do pedido:** 4 (quatro)

(iv) **Formato para leitura no computador:** Microsoft Word; Windows XP; computador tipo PC.

2) Informações gerais das seqüências

Características das moléculas seqüenciadas:

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 1:

a) Tamanho da seqüência : **3613 pares de bases**

b) Tipo da seqüência: **Ácido nucléico**

c) número identificador da seqüência: ***M 14341.1 GI: 149923 (Pubmed Protein)***

d) topologia: **DNA linear**

3) Características da molécula seqüenciada: Seq. ID Nº 1:

a) tipo: **DNA**

b) nome: ***M. leprae 65kd antigen***

c) produto do gene: ***Proteína de choque térmico HPS65***

d) fonte original da molécula: ***organism="Mycobacterium leprae"***
mol_type="genomic DNA"

e) posição da seqüência no genoma: ***1...3613 táxon 1769***

f) fenótipo associado: ***proteína de choque térmico hsp65 M. leprae***

g) atividade biológica: **proteína de choque térmico atuando como chaperona, participando do dobramento , desdobramento e montagem de proteínas, prevenindo desnaturação e agregação protéica. Também exercem atividade ATPase e transporte de peptídeos.**

h) localização celular: **São encontradas em diversos compartimentos celulares como citosol, núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria e cloroplastos.**

Descrição da Sequência

GAATTCCGGA ATTGCACTCG CCTTAGGGGA GTGCTAAAAA TGATCCTGGC ACTCGCGATC 60
 AGCGAGTGCC AGGTCGGGAC GGTGAGACCC AGCCAGCAAG CTGTGGTTCGT CCGTCGCGGG 120
 CACTGCACCC GGCCAGCGTA AGTAATGGGG GTTGTTCGGCA CCCGGTGACC CTAGCTTCAT 180
 TCCTAATCCG GAGGAATCAC TTCGCAATGG CCAAGACAAT TGCGTACGAC GAAGAGGCC 240
 GTCGCGGCCT CGAGCGGGGC TTGAACAGCC TCGCCGACGC GGTAAAGGTG ACGTTGGGTC 300
 CGAAGGGGCG CAACGTCGTT CTAGAGAAGA AGTGGGGTGC TCCCACGATC ACCAACGATG 360
 GCGTGTCCAT CGCCAAGGAG ATCGAGCTGG AGGACCCGTA CGAGAAGATT GGCCTGAGT 420
 TGGTCAAGGA AGTCGCCAAG AAGACAGATG ACGTCGCCCG TGATGGCACC ACGACGGCCA 480
 CCGTGCTGGC CCAGGCATTG GTCAAAGAGG GCCTACGCAA CGTCGCGGCC GGCGCCAACC 540
 CGCTAGGTCT CAAGCGTGGC ATCGAGAAAG CTGTTCGATAA GGTAAGTGA ACTCTGCTCA 600
 AGGACGCTAA GGAGGTCGAA ACCAAGGAAC AAATTGCTGC CACTGCAGCG ATTTGCGCGG 660
 GTGACCAGTC GATCGGTGAT CTGATCGCCG AGGCGATGGA CAAGGTTGGC AACGAGGGTG 720
 TTATCACCGT CGAGGAATCC AACACCTTCG GTCTGCAGCT CGAGCTCACC GAGGGAATGC 780
 GGTTGACAA GGGCTACATT TCGGGCTACT TCGTCACCGA CGCCGAGCGT CAGGAAGCTG 840
 TCCTAGAGGA GCCCTACATC CTTCTGGTCA GCTCCAAAGT GTCTACCGTC AAGGACCTGC 900
 TGCCGCTGCT AGAGAAGGTC ATCCAGGCCG GCAAGTCGCT GCTGATCATT GCTGAGGATG 960
 TCGAGGGTGA GCGGTTGTCT ACCCTGGTGC TCAACAAGAT CCGTGGCACT TTCAAGTCGG 1020
 TGGCGGTCAA AGCTCCTGGC TTTGGTGACC GCCGCAAGGC AATGTTGCAA GACATGGCCA 1080
 TTCTCACCGG AGCCCAGGTC ATCAGCGAGG AGGTCGGTCT CACATTGGAG AACACCGATC 1140
 TGTCATTGCT GGGCAAGGCC CGCAAGGTGG TTATGACCAA GGACGAAACC ACCATCGTCG 1200
 AGGGTGCCGG TGACACCGAC GCCATCGCCG GGCAGTGGC TCAGATCCGT ACCGAGATCG 1260
 AGAACAGTGA CTCTGACTAT GACCGCGAGA AACTGCAGGA ACGCCTGGCT AAGTTGGCCG 1320
 GTGGTGTGTC GGTGATCAAG GCCGGTGCTG CCACTGAGGT GGAGCTCAAG GAGCGCAAGC 1380
 ACCGCATCGA GGACGCAGTC CGCAACGCCA AGGCCGCGGT GGAGGAGGGG ATCGTCGCCG 1440
 GCGGCGGTGT GACTCTGCTA CAGGCTGCTC CGGCTCTGGA CAAGCTGAAG CTGACCGGTG 1500
 ACGAGGCGAC CCGTGCCAAT ATGTGCAAGG TGGCGTTGGA AGCTCCGCTC AAGCAGATCG 1560
 CCTTCAATTC CGGGATGGAG CCCGGCGTGG TGGCCGAAA GGTGCGTAAC CTTTCAGTGG 1620
 GTCACGGCCT GAACGCCGCC ACCGGTGAGT ACGAGGACCT GCTCAAGGCC GGCCTTGGCC 1680
 ACCCGGTGAA GGTTACACGT TCTGCGCTGC AGAACGCAGC GTCCATCGCC GGCCTGTTCC 1740
 TTACTIONGGA GGCCGTCGTC GCCGACAAGC CGGAGAAGAC GGCAGCTCCG GCGAGCGACC 1800
 CGACCGGTGG CATGGGTGGT ATGGACTTCT GACGTCCGGT CATGATGCAG GTAGCTACGT 1860
 GGTCTGAAGT GGGGTACTTC ATCAACTGAG TAGCGGCGGG CGAACTGGAC AATCGAATTA 1920
 GGAGTTGACA AAGAAAAGA GCCCGGCCCC CCAAAAAAAG GGACCGGGCT CTTTCTTGT 1980
 CTTGCGCGTC CAGGGGAGTC GGGCTTGGCC TCGAGGTGCA GGAGCGTGGG TCGGAACGAC 2040
 ACTGAACCGG GCAGTCTCGT TGCCGGGGCT CGCGTCGTTG CGCTGGAAGG AGCGCGCGCG 2100
 CCCGAGCCGT TCTAGGGTGT TGTGGGTGTT TCATAGGTGG TGGGTGAAAT GGCTGTTTTT 2160
 GCGTTTTATG ACTGGCCGAT ATGTTCCGTA GTCGTGGGGG GCAGCCCGGA ATCCTGTTGA 2220
 CGTGTTTTGC TGTGTTGCGG GTTTTTGT GGTGGGTGGC TGACTGCCTG CTTTCGATGA 2280
 GGCTTCGTGT GCTTTGCCGC AGTGGACACG ATTAGCGCGG CGCACGTAAG CATGTCGGTG 2340
 GTGGGTGCTG CTTGGTCTAC ATGTTGATGA TGCCAGGGGC TGGGCACCTG GGCTGTGCTG 2400
 AAGGCGATAT CGATGCAGGC GTGGGTGTGA GGGTAGTTGT TAGCGCCGCG GGGTAGGGGC 2460
 GTTTTAGTGT GCATGTCATG GCCTTGAGGT GTCGGCGTGG TCAATGTGGC CGCACCTGAA 2520
 CAGGCACGTC CCCGTGCACG GTATAACTAT TCGCACCTGA TGTTATCCCT TGCACCATTT 2580
 CTGCCGCTGG TATCGGTGTC GGCGGCTTGT TGACCGGCC TCAGCCAGCA AGCAGGCATG 2640
 CCGCCGGGTG CAGCAGTATC GTGTTAGTGA ACAGTGCATC GATGATCCGG CCGTCGGCGG 2700
 CACATACGGC AACCTTCTAG CGCAGATCAA CCACCCACAC CCCACCAGCC CACCACAACA 2760

CCACCACCCA AACCAAACCA GCAAAAAATA ACCACCAAAT GACCATCACG ACGACGATAT
2820
GGTGGGTGCG TTCAGCGCGC AGATGCCCGC TGCCGCCGCA TAGCAACCCG GTTGGGATCA 2880
ACGCTGTGTT GGGCAGTAGC AGGTTAGAGT AGGCTGAGGC TAGCGCAATC GCGACTGAGA 2940
GATCTGGTGC CGGATCGGTT AACCGCATGC CGTCTACGGT GAAAAGATAG ACGTTATTGA 3000
CCGCGATGCT CTAGTTGGTT GTGTTTTTCC AGGGCGGTGG TGGCTATAGC TGCCCGGGCG 3060
TGTGTCGATC CTGTTGATGA CACGGCGCGG CGAGCCACTA ATATGGCGTT GCCAATAGCG 3120
TCTGGATCTC GCCGATGAGT GGTTGCTTTC CTCCACCCAG TGTCATCGTG ATCGCAGTAC 3180
CGGCTACCGG TGTTGGCCGC TGATTGATTG AAGAAAAGGT TTCAATGGAT CGGCAACGTC 3240
GTCGATTCCG TCGTCACGCA ACAGGAAACA CTCGACTTTG TCACTTTGTC GGTGGCTCCG 3300
AATTGATTCT TGACGTCCCG GACCGTCTGC ATCGGGTAGT TTGTGATTTT CCTGCGAATG 3360
CAGCACTACG TCGACGAGGT GTTCGAGCGA GTACGGCCTG GCGATGGACC CGTCTTTGGT 3420
GACATGTCCG ACCAGAATCA ACGCAACTAC CGTTGGCTTT GCGGTTCCGGC GTCGTTGTTA 3480
CGGCACGTAC TTGGGTGCCA CCACCGGTGA TTTCGTCGGC TTCGGTGAGT GGCCATGGTT 3540
TGCCTGAGG CGGTGCTGCT CAGCGCAGAC AGACCATCAC GACGTGGCCC AGCACGGTGT 3600
GCAGGTCGAA TTC 3613

Descrição da sequência: Seq. ID Nº 2:

- a) Tamanho da sequência : **146 aminoácidos**
- b) Tipo da sequência: **aminoácidos**
- c) número identificador da sequência: **NP_962635.1 GI:41409799 (Pubmed Protein)**
- d) topologia: **LINEAR**

3) Características da molécula seqüenciada: Seq. ID Nº 2:

- a) tipo: **aminoácido**
- b) nome: **Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis K-10**
- c) fonte original da molécula: **Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis K-10**
- e) posição da sequência no genoma: **1 a 146 aa (resíduos)**

Descrição da Sequência

MSNLALWTRP AWDTRWLRD FFGPAAAADW NKPATSAFKP AAEIVKDGDD AIVRVELPGV 60
DVDQDVQVEL DRGRLVIRGE HRDEHAEKGD GRTLREIRYG SFHRSFQLPG HVTDDDITAS 120
YDAGVLTVRV TGAYAGNQAK RIAITK 146

Descrição da sequência: Seq. ID Nº 3:

- a) Tamanho da sequência : **235 aminoácidos**
- b) Tipo da sequência: **aminoácidos**
- c) número identificador da sequência: **NP_214865.1 GI:15607492 (Pubmed Protein)**
- d) topologia: **LINEAR**

3) Características da molécula seqüenciada: Seq. ID N° 3:

- a) tipo: **aminoácido**
- b) nome: **PROBABLE GRPE PROTEIN (HSP-70 COFACTOR)**
[Mycobacterium tuberculosis H37Rv]
- c) fonte original da molécula: **Mycobacterium tuberculosis H37Rv**
- e) posição da seqüência no genoma: **1 a 235 aa (resíduos)**

Descrição da Seqüência

MTDGNQKPDG NSGEQVTVTD KRRIDPETGE VRHVPPGDMP GGTAADAHAH TEDKVAELTA 60
DLQRVQADFA NYRKRALRDQ QAAADRAKAS VVSQLLGVLD DLERARKHGD LESGPLKSVA 120
DKLDSALTGL GLVAFGAEGE DFDPVLHEAV QHEGDGGQGS KPVIGTVMRQ GYQLGEQVLR 180
HALVGVVDTV VVDAAELESV DDGTAVADTA ENDQADQGNs ADTSGEQAES EPSGS 235

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 4:

- a) Tamanho da seqüência : **193 aminoácidos**
- b) Tipo da seqüência: **Resíduos de aminoácidos**
- c) número identificador da seqüência: **BAA07184 gi:531029 (Pubmed Protein)**
- d) topologia: **LINEAR**

3) Características da molécula seqüenciada: Seq. ID N° 4:

- a) tipo: **aminoácido**
- b) nome: **MPT70 M tuberculosis H37Rv**
- c) fonte original da molécula: **M tuberculosis H37Rv**
- e) posição da seqüência no genoma: **1 a 193 aa (resíduos)**

Descrição da Seqüência

MKVKNTIAAT SFAAAGLAAL AVAVSPPAAA GDLVGP GCAE YAAANPTGPA SVQGMSQDPV 60
AVAASNNPEL TTLTAALSGQ LNPQVNLVDT LNSGQYTVFA PTNAAF SKLP ASTIDELKTN 120
SSLLTSILTY HVVAGQTSPA NVVGTRQTLQ GASVTVTGQG NSLKVGNADV VCGGVSTANA 180
TVYMIDSVLM PPA 193

REIVINDICAÇÕES

1. USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICOBACTERIANA descritos por construções de ácidos nucléicos compreendendo uma seqüência codificadora, operacionalmente ligadas a um promotor capaz de expressar tais seqüências codificadoras em células de hospedeiros mamíferos **caracterizado por** ser para preparação de uma composição medicamentosa

ou vacinal para o controle micoses em seres humanos e animais, sendo o controle abrangendo a prevenção, tratamento e cura de doenças causadas por fungos.

2. USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICROBACTERIANA de diferentes tamanhos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelos** imunomoduladores plasmidiais serem descritos pelas Seq. ID Nº 1 a 4, preferencialmente o de Seq. ID Nº 1.

3. USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICROBACTERIANA de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pelo** fato do biofármaco ou composição medicamentosa ser utilizado no controle de doenças fúngicas, dentre Candidíase, Histoplasmose, Blastomicose, Sporotricose, Cryptococose, Aspergilose, Coccidioidomicose e Paracoccidioidomicose ou Pbmicose, principalmente as causadas por fungos do gênero *Paracoccidioides*, preferencialmente *Paracoccidioides brasiliensis*.

4. USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICROBACTERIANA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato do gene de expressão da proteína de choque térmico de diferentes tamanhos ser de origem bacteriana, de mamíferos ou micobacteriana, principalmente as HSP10, HSP65 e HSP70, preferencialmente a HSP65.

5. USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICROBACTERIANA de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato do gene de expressão da proteína de choque térmico de origem micobacteriana ser particularmente do gênero *Mycobacterium*, principalmente as espécies *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* e de *Mycobacterium leprae*, preferencialmente de *Mycobacterium leprae*.

6. USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICROBACTERIANA de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pelo** fato da formulação da composição medicamentosa ou vacinal compreender pelo menos um veículo, um diluente, um solvente, um sistema de liberação controlada e/ou excipientes farmacologicamente aceitáveis, estabilizados em fase homogênea ou heterogênea.

7. USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICROBACTERIANA de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato do imunomodulador ser utilizado de forma isolada ou em associação com outros imunomoduladores ou outros compostos antifúngicos, a serem administrados de forma única ou com outros medicamentos ou preparações imunoterapêuticas, em dose única ou em doses múltiplas.

8. USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICROBACTERIANA de acordo com a reivindicação 6 ou 7, **caracterizado pelo** fato da formulação da composição medicamentosa compreender uma forma de apresentação em conformidade com as vias de

administração, dentre via tópica, nasal, oral, inalação, transdérmica, retal ou parenteral, sendo preferidas as vias oral ou injeção.

9. USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICROBACTERIANA de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato da apresentação da formulação medicamentosa ou vacinal possibilitando via de administração parenteral ser por uma das vias, subcutânea, intradérmica, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal, preferencialmente injeções no músculo esquelético ou na pele de humanos ou animais.

10. USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICROBACTERIANA de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato da apresentação da formulação medicamentosa possibilitando via de administração tópica serem preferencialmente por, inalação por aerossol, administração nasal ou aplicação na superfície da pele de mamíferos.

11. USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICROBACTERIANA de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato da liberação controlada compreender diferentes sistemas ou suas combinações, dentre polímeros biocompatíveis, matrizes poliméricas, cápsulas, microcápsulas, nanocápsulas, micropartículas, nanopartículas, lipossomas, lipoesferas, pós secos e sistemas de liberação transdérmica.

12. USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICROBACTERIANA de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato da composição medicamentosa ou vacinal seja formulada e/ou veiculada em meios aquosos, em emulsões óleo/água ou óleo/água/óleo, formando fase homogênea ou heterogênea.

13. USO DO IMUNOMODULADOR PLASMIDIAL EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE ESTRESSE MICROBACTERIANA de acordo com uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizado pelo** fato da micose estar ou não associada a síndrome da imunodeficiência adquirida.

X. Referências Bibliográficas

1. Abdul-Wahid A, Faubert G. Mucosal delivery of a transmission-blocking DNA vaccine encoding *Giardia lamblia* CWP2 by *Salmonella typhimurium* bactofection vehicle. *Vaccine*. 2007; 25(50):8372-83.
2. Abuodeh RO, Shubitz LF, Siegel E, Snyder S, Peng T, Orsborn KI, Brummer E, Stevens DA, Galgiani JN. Resistance to *Coccidioides immitis* in mice after immunization with recombinant protein or a DNA vaccine of a proline-rich antigen. *Infect Immun*. 1999;67:2935–2940
3. Adams DO. The granulomatous inflammatory response. 1: *Am J Pathol*. 1976; 84(1):164-92.
4. Amaral, AC, Bocca AL, Ribeiro AM, Alice M. Ribeiro, Nunes J, Peixoto DLG, Simioni AR, Laçava ZGM, Bentes,R, Titze-de-Almeida R, Tedesco AC, Morais PC e Felipe MSS. NanoAnf: AMB-PLGA nanoparticle for mycoses treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*
5. Atkinson AJ Jr, Bennett JE, Amphotericin B pharmacokinetics in humans. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1978;13(2):271-6.
6. Berliner MD, Reca ME. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus Green B. *Sabouraudia* 1966; 5:26–29.
7. Blanden RV, Lefford MJ, Mackaness GB. The host response to Calmette-Guérin bacillus infection in mice. *J Exp Med*. 1969;1;129(5):1079-107
8. Bocca, A. L., E. E. Hayashi, A. G. Pinheiro, A. B. Furlanetto, A. P. Campanelli, F. Q. Cunha, and F. Figueiredo. 1998. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J. Immunol*. 161:3056-3063
9. Bonato VL, Lima VM, Tascon RE, Lowrie DB, Silva CL. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun*. 1998; 66(1):169-75.
10. Boscardin RN, Brandão H, Balla A. Bronchoalveolar lavage findings in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia*. 1985;23(2):143-6

11. Brenner BG, Wainberg Z. Heat shock proteins: novel therapeutic tools for HIV-infection? *Expert Opin Biol Ther.* 2001; 1(1):67-77
12. Brown GD, Gordon S, Dunn W. Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity.* 2003;19:311–315.
13. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun.* 1989;57(8):2289-94.
14. Brummer, E., Castaneda, E.; Restrepo, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1993; 6: 89-117.
15. Calich VL, Kipnis TL, Mariano M, Neto CF, Dias da Silva WD. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. *Clin Immunol Immunopathol.* 1979;12(1):21-30.
16. Camargo ZP, Gesztesi JL, Saraiva EC, Tabora CP, Vicentini AP, Lopes JD. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis J *Clin Microbiol.* 1994;32(10):2377-81.
17. Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, Vaz CA, Burger E, Calich VL. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 1998; 66(2):800-6.
18. Cano LE, Singer-Vermes LM, Costa TA, Mengel JO, Xidieh CF, Arruda C, André DC, Vaz CA, Burger E, Calich VL. Depletion of CD8+ T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 2000;68:352–359.
19. Cao C, Lin X, Wahi MM, Jackson EA, Potter H Jr. Successful adjuvant-free vaccination of BALB/c mice with mutated amyloid beta peptides. *BMC Neurosci.* 2008; 9(1):25. *Vaccine.* 2007; 25(52):8741-55.
20. Castaneda E, Brummer E, Pappagianis D, Stevens DA. 1988 Regulation of immune responses by T suppressor cells and by serum in chronic paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol.* 1988 Nov;117(1):1-11.

21. Chakrabarti A. Microbiology of systemic fungal infections. *J Postgrad Med.* 2005;51 Suppl 1:S16-20.
22. Chiarella AP, Arruda C, Pina A, Costa TA, Ferreira RC, Calich VL. The relative importance of CD4+ and CD8+T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 2007;9(9):1078-88.
23. Cisalpino PS, Puccia R, Yamauchi LM, Cano MI, da Silveira JF, Travassos LR. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem.* 1996;271(8):4553-60.
24. Cock AM, Cano LE, Vélez D, Aristizábal BH, Trujillo J, Restrepo A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *paracoccidioides brasiliensis* propagules. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000;42(2):59-66.
25. Coelho EA, Tavares CA, Lima K de M, Silva CL, Rodrigues JM Jr, Fernandes AP. Mycobacterium hsp65 DNA entrapped into TDM-loaded PLGA microspheres induces protection in mice against *Leishmania* (*Leishmania*) *major* infection. *Parasitol Res.* 2006; 98(6):568-75.
26. Coelho-Castelo AA, Trombone Ap, Rosada RS, Santos RR Jr., Bonato VL, Sartori A, Silva CL. Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery. *Genet Vaccines Ther.* Jan 2006;30;4:1.
27. Cutler JE, Deepe GS Jr, Klein BS. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(1):13-28
28. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med.* 1995; 1;181(2):537-46.
29. de Brito T, Franco MF. Granulomatous inflammation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1994; 36(2):185-92.
30. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell

proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 1991;174(4):915-24.

31. Deepe GS Jr, Gibbons R, Brunner GD, Gomez FJ. A protective domain of heat-shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. *Infect Dis.* 1996;174(4):828-34.

32. Deepe GS Jr, Gibbons RS. Cellular and molecular regulation of vaccination with heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 2002; 70(7):3759-67.

33. Diniz SN; Reis, BS; Goes TS.; Zouain CS; Leite MF e Goes, AM. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine*, 22: 485-92, 2004.

34. Domer LR, Gottlieb EL, Johnson DA. JCO orthodontic practice study: practice growth. *J Clin Orthod.* 1982;16 (1):194-9.

35. Dumonteil, E. DNA Vaccines against protozoan parasites: advances and challenges. *J Biomed Biotechnol.* 2007; (6):90520.

36. Eyquem A. One century after Louis Pasteur's victory against rabies. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1986; 10(3):132-4.

37. Fałkowska-Podstawka M, Wernicki A. Heat shock proteins in health and disease. *Pol J Vet Sci.* 2003;6(1):61-70.

38. Fonseca DM, Bonato VL, Silva CL, Sartori A. Th1 polarized response induced by intramuscular DNA-HSP65 immunization is preserved in experimental atherosclerosis. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(11):1495-504. 2007

39. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1987; 25(1):5-18.

40. Franco M; Peraçoli, MT.; Soares A.; Montenegro, R.; Mendes, R. P.; Meira, D. A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr. Top. Med. Mycol.*, 5: 115- 149, 1993.

41. Franco L, Najvar L, Gomez BL, Restrepo S, Graybill JR, Restrepo A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58(4):424-30.
42. Fukui H., Koike T., Nakagawa T., Saheki A., Sonoke S., Tomii Y., Seki J. Comparison of LNS-AmB, a novel low-dose formulation of amphotericin B with lipid nano-sphere (LNS), with commercial lipid-based formulations. *Int J Pharm.* 2003; 28;267(1-2):101-12.
43. García GA, Arnaiz MR, Laucella SA, et al. Immunological and pathological responses in BALB/c mice induced by genetic administration of Tc13 Tul antigen of *Trypanosoma cruzi* . *Parasitology.* 2006;132(6):855–866.
44. Garg N, Tarleton RL. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity.* 2002;70(10):5547–5555.
45. Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 1981; 212.4490, 56 – 58.
46. Gómez AM, Bullock WE, Taylor CL, Deepe GS Jr. Role of L3T4+ T cells in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 1988;56 (7):1685-91
47. Gotz H. Acrodermatitis chronica atrophicans Hexheimer as an infectious disease. *Hautarzt.* 1954; 5(11):491-504.
48. Gu QL, Huang X, Ren WH, Shen L, Liu BY, Chen SY. Targeting hepatitis B virus antigens to dendritic cells by heat shock protein to improve DNA vaccine potency. *World J Gastroenterol.* 2007 28;13(44):5911-7.
49. Guérin N. *Rev Med Interne.* History of vaccination: from empiricism towards recombinant vaccines. 2007; (1):3-8.
50. Hart PH, Jones CA, Finlay-Jones JJ. Monocytes cultured in cytokine-defined environments differ from freshly isolated monocytes in their responses to IL-4 and IL-10. *J Leukoc Biol.* 1995;57(6):909-18.

51. Heikema A, Agsteribbe E, Wilschut J, Huckriede A. Generation of heat shock protein-based vaccines by intracellular loading of *gp96* antigenic peptides. *Immunology Letters*, 1997.v.57, p. 9-74,
52. Hostetler JS, Brummer E, Coffman RL, Stevens DA. Effect of anti-IL-4, interferon-gamma and an antifungal triazole (SCH 42427) paracoccidioidomycosis: correlation of IgE levels with outcome. *Clin Exp Immunol*. 1993; 94(1):11-6.
53. Huang X, Liu L, Ren L, Qiu C, Wan Y, Xu J. Mucosal priming with replicative *Tiantan vaccinia* and systemic boosting with DNA vaccine raised strong mucosal and systemic HIV-specific immune responses. *Vaccine*. 2007; 17;25(52):8874-84.
54. Huffnagle GB, Yates JL, Lipscomb MF. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4+ and CD8+ T cells. *J Exp Med* 1991;173:793–800
55. Hung CF, Monie A, Alvarez RD, Wu TC. DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside. *Exp Mol Med*. 2007; 31;39(6):679-89.
56. Huygen, K. On the use of DNA vaccines for the profilaxis of Mycobacterial diseases. *Infect. Imm.* 2003; 71:1613-1621
57. Itoh K e Yamada A. Personalized peptide vaccines: a new therapeutic modality for cancer. *Cancer Sci*. 2006; 97(10):970-6.
58. Ivey FD, Magee DM, Woitaske MD, Johnston SA, Cox RA. Identification of a protective antigen of *Coccidioides immitis* by expression library immunization. *Vaccine*. 2003;21:4359–4367.
59. Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CA, Burger E, Singer LM, Calich VL. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res*. 2000;20(1):89-97.
60. Kim D, Gambhira R, Karanam B, Monie A, Hung CF, Roden R, Wu TC. Generation and characterization of a preventive and therapeutic HPV DNA vaccine. *Vaccine*. 2008; 17;26(3):351-60.

61. Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW. Th1 and Th2 responses regulate experimental lung granuloma development. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 1996;13(2):120-8.
62. Kurokawa CS, Araujo JP Jr, Soares AM, Sugizaki MF, Peraçoli MT. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiol Immunol.* 2007;51(4):421-8.
63. Jimenez BE, Murphy JW. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. *Infect Immun.* 1984; 46(2):552-8.
64. Levy MY, Barron LG, Meyer KB, Szoka FC Jr. Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Ther.* 1996;3(3):201-11.
65. Li K, Yu JJ, Hung CY, Lehmann PF, Cole GT. Recombinant urease and urease DNA of *Coccidioides immitis* elicit an immunoprotective response against coccidioidomycosis in mice. *Infect Immun* 2001;69:2878–2887.
66. Lima KM., Dos Santos SA., Santos RR., Brandão IT., Rodrigues JM. JR, Silva CL. Efficacy of DNA-*hsp65* vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. *Vaccine.* 2003; 22:49–56.
67. Lindquist S. Heat-shock gene-expression. *In vitro cell. & Dev. biol,* v. 22 , p.A43-A43, 1986.
68. Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature.* v.26;p. 336-42, 1998.
69. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD, Lima VM, Faccioli LH, Stravropoulos E, Colston MJ, Hewinson RG, Moelling K, Silva CL. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999; 100: 269-271.
70. Luo Y, Zhou H, Mizutani M, Mizutani N, Liu C, Xiang R, Reisfeld RA. A DNA vaccine targeting Fos-related antigen 1 enhanced by IL-18 induces long-lived T-cell memory against tumor recurrence. *Cancer Res.* 2005 Apr 15;65(8):3419-27
71. Mackaness GB. Cellular resistance to infection.. *J Exp Med.* 1962;1;116:381-406.

72. Manoj S, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. Approaches to enhance the efficacy of DNA vaccines. *Crit Rev Clin Lab Sci.*2004;41(1):1-39.
73. Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M, Dwarki V. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gene Ther.* 1993;4(4):419-31.
74. Martin JE, Pierson TC, Hubka S, Rucker S, Gordon IJ, Enama ME, Andrews CA, Xu Q, Davis BS, Nason M, Fay M, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Gomez PL, Mascola JR, Chang GJ, Nabel GJ, Graham BS. A West Nile virus DNA vaccine induces neutralizing antibody in healthy adults during a phase 1 clinical trial. *J Infect Dis.* 2007;196(12):1732-40.
75. Marques AF, da Silva MB, Juliano MA, Travassos LR, Taborda CP. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(8):2814-9.
76. Massa C., Massa C, Melani C, Colombo MP. Chaperon and adjuvant activity of hsp70: different natural killer requirement for cross-priming of chaperoned and bystander antigens. *Cancer Res.*v. 65 2005.p.7942-49,
77. Matthews RC, Burnie JP, Howat D, Rowland T, Walton F. Autoantibody to heat-shock protein 90 can mediate protection against systemic candidosis. *Immunology.* 1991;74(1):20-4.
78. Matthews R, Hodgetts S, Burnie J. Preliminary assessment of a human recombinant antibody fragment to hsp90 in murine invasive candidiasis. *J Infect Dis.* 1995 ; 171(6):1668-71. 1995
79. McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol.* 1987;25(3):165-75.
80. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:165-90.

81. Mota NG, Peraçoli MT, Mendes RP, Gattass CR, Marques SA, Soares AM, Izatto IC, Rezkallah-Iwasso MT. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1988; 26(2):105-11.
82. Multhoff G. Heat shock proteins in immunity. *Handb Exp Pharmacol*, v.172, p.279-04. Campos MC, Gesztesi JL, Vincentini AP, Lopes JD, Camargo ZP. Expression and isoforms of Gp43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1995;33(4):223-7.
83. Nosanchuk JD, Steenbergen JN, Shi L, Deepe GS Jr, Casadevall A. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest.* 2003;112:1164–1175.
84. O'Hagan DT, MacKichan ML, Singh M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomol Eng.* 2001;18(3):69-85.
85. Paula L, Silva CL, Carlos D, Matias-Peres C, Sorgi CA, Soares EG, Souza PRM, Bládes CRZ, Galetti FCS, Bonato VLD, Gonçalves EDC, Silva EVG, Faccioli LH. Genetic comparison of different delivery systems of DNA vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccines and Therapy* 2007. *Genetic* 24:5:2.
86. Peibin Y, Shude Y, Changzhi H. Heat shock protein gp96 and cancer immunotherapy. *Chin Med Sci J.* 2002;17(4):251-6.
87. Pereira-Chioccola VL, Costa F, Ribeirão M, *et al.* Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. *Parasite Immunology.* 1999;21(2):103–110
88. Planelles L, Thomas MC, Alonso C, López MC. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infection and Immunity.* 2001;69(10):6558–6563.
89. Pinto AR, Puccia R, Diniz SN, Franco MF, Travassos LR. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine.* 2000;18(26):3050-8
90. Prugnaud JL. DNA vaccines. *Ann Pharm Fr.* 2003;61(4):219-33.

91. Razzell, PE. Edward Jenner: The history of a medical myth. *Med Hist.* 1965; (9):216-29.
92. Raska M, Beláková J, Wudattu NK, Kafková L, Růžicková K, Sebestová M, Kolár Z, Weigl E. *Folia Microbiol (Praha)*. Comparison of protective effect of protein and DNA vaccines hsp90 in murine model of systemic candidiasis 2005;50(1):77-82.
93. Restrepo, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J. Med. Vet. Mycol.*, 23: 323-334, 1985.
94. Rey M e Girard MP. The global eradication of poliomyelitis: Progress and problems. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect Dis.* 2007.
95. Ritossa P. Problems of prophylactic vaccinations of infants. *Riv Ist Sieroter Ital.* 1962 Mar-37:79-108.
96. Rodrigues MM, Ribeirão M, Pereira-Chioccola V, Renia L, Costa F. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infection and Immunity.* 1999;67(8):3855–3863.
97. Roman LD, Wilczynski S, Muderspach LI, Burnett AF, O'Meara A, Brinkman JA, Kast WM, Facio G, Felix JC, Aldana M, Weber JS. A phase II study of Hsp-7 (SGN-00101) in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2007; 106(3):558-66.
98. Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. *Cytokine.* 2002;7;18(3):149-57.
99. Ruberti M, De Melo LK, Dos Santos SA, Brandao IT, Soares EG, Silva CL, Júnior JM. Prime-boost vaccination based on DNA and protein-loaded microspheres for tuberculosis prevention. *J Drug Target.* 2004 May;12(4):195-203.
100. Sagodira S, Iochmann S, Mevelec MN, Dimier-Poisson I, Bout D. Nasal immunization of mice with *Cryptosporidium parvum* DNA induces systemic and intestinal immune responses. *Parasite Immunol.* 1999; 21(10):507-16.

101. Saliou P. Eradication of infectious diseases by vaccination. *Med Trop* 2007; 67(4):321-7.
102. Santos-Junior RR, Sartori A, De Franco M, Filho OG, Coelho-Castelo AA, Bonato VL, Cabrera WH, Ibañez OM, Silva CL. Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in an animal model of arthritis. *Hum Gene Ther.* 2005;16(11):1338-45.
103. Santos Júnior RR, Sartori A, Bonato VL, Coelho Castelo AA, Vilella CA, Zollner RL e Silva CL. Immune modulation induced by tuberculosis DNA vaccine protects non-obese diabetic mice from diabetes progression. *Clin Exp Immunol.* 2007; 149(3):570-8.
104. SenGupta D, Norris PJ, Suscovich TJ, Hassan-Zahraee M, Moffett HF, Trocha A, Draenert R, Goulder PJ, Binder RJ, Levey DL, Walker BD, Srivastava PK, Brander C. Heat shock protein-mediated cross-presentation of exogenous HIV antigen on HLA class I and class II. *J Immunol.* 2004;1;173(3):1987-93
105. Srivastava PK. Purification of heat shock protein-peptide complexes for use in vaccination against cancers and intracellular pathogens. *Methods.* 1997;12(2):165-71.
106. Srivastava PK, Menoret A, Basu S, Binder RJ, McQuade KL. *Immunity.*; 1998; 8(6):657-65. Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world.
107. Shedlock DJ, Weiner DB. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol.* 2000; 68(6):793-806.
108. Shikanai-Yasuda MA, Telles FQ, Mendes RP, Colonbo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(3):297-310.
109. Silva CL, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Leão SC. Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin or DNA vaccination. *Immunology* 1999; 97:573-581
110. Silva CL., Bonato VL, Coelho-Castelo AAM., de Souza AO, Santos AS., Lima KM., Faccioli LH, Rodrigues JM. Immunotherapy with plasmid DNA encoding mucobacterial *hsp65* in association with

chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. 2005. *Gene Therapy* 12: 281-287.

111. Somboonthum P, Yoshii H, Okamoto S, Koike M, Gomi Y, Uchiyama Y, Takahashi M, Yamanishi K, Mori Y. Generation of a recombinant Oka varicella vaccine expressing mumps virus hemagglutinin-neuraminidase protein as a polyvalent live vaccine. 1: *Vaccine*. 2007; 17;25(52):8741-55.

112. Singer-Vermes LM, Caldeira CB, Burger E, Calich LG. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol*. 1993;94(1):75-9.

113. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol*. 2000;156(5):1811-20.

114. Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, Franco M, Travassos LR Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun*. 1998; 66(2):786-93

115. Thomassen MJ, Divis LT, Fisher CJ. Regulation of human alveolar macrophage inflammatory cytokine production by interleukin-10. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996; 80(3 Pt 1):321-4.

116. Tissieres, A., Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, 1974; v.84, p.389-99,

117. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4

118. Trombone AP, Silva CL, Almeida LP, Rosada RS, Lima KM, Oliver C, Jamur MC, Coelho-Castelo AA. Tissue distribution of DNA-Hsp65/TDM-loaded PLGA microspheres and uptake by phagocytic cells. *Genet Vaccines Ther*. 2007;20;5:9.

119. Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos LR e Lopes JD. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein *gp43* leads to enhancement of fungal pathogenesis.
120. Ulmer JB, Fu TM, Deck RR, Friedman A, Guan L, DeWitt C, Liu X, Wang S, Liu MA, Donnelly JJ, Caulfield MJ. Protective CD4⁺ and CD8⁺ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J Virol*. 1998;72(7):5648-53.
121. Webster RG, Robinson HL. DNA vaccines: a review of developments. *BioDrugs*. 1997;8(4):273-92.
122. Wong LP, Woo PC, Wu AY, Yuen KY. DNA immunization using a secreted cell wall antigen Mp1p is protective against *Penicillium marneffei* infection. *Vaccine*. 2002;20:2878–2886.
123. Wüthrich M, Filutowicz HI, Warner T, Deepe GS, Klein BS. Vaccine immunity to pathogenic fungi overcomes the requirement for CD4⁺ help in exogenous antigen presentation to CD8⁺ T cells implications for vaccine development in immune-deficient hosts. *J Exp Med* 2003;197:1405–1416.
124. Zügel U, Kaufmann SH. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(1):19-39.