



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB  
Faculdade de Medicina  
Pós-Graduação em Patologia Molecular

# Imunogenicidade da Trr1 e seu uso potencial como alvo-molecular para imunoterapia em fungos patogênicos humanos

Fabiana Freire Mendes de Oliveira

Brasília,  
2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB  
Faculdade de Medicina  
Pós-Graduação em Patologia Molecular

# Imunogenicidade da Trr1 e seu uso potencial como alvo-molecular para imunoterapia em fungos patogênicos humanos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Doutorado em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e desenvolvida no Laboratório de Imunologia Celular da mesma Universidade para a obtenção do título de doutor.

Orientada: Fabiana Freire Mendes de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe

Co-orientador: Prof. Dr. André Moraes Nicola

Brasília,  
2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

OOL48i Oliveira, Fabiana  
Imunogenicidade da Trrl e seu uso potencial como alvo molecular para imunoterapia em fungos patogênicos humanos / Fabiana Oliveira; orientador Maria Sueli Soares Felipe; co orientador André Moraes Nicola. -- Brasília, 2018.  
124 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Patologia Molecular) -- Universidade de Brasília, 2018.

1. Imunologia. 2. Anticorpos. 3. Fungos patogênicos humanos. 4. Microbiologia. I. Soares Felipe, Maria Sueli, orient. II. Moraes Nicola, André , co-orient. III. Título.

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Fabiana Freire Mendes de Oliveira

# Imunogenicidade da Trr1 e seu uso potencial como alvo-molecular para imunoterapia em fungos patogênicos humanos

Brasília, 28 de novembro de 2018.

---

Orientadora: Maria Sueli Soares Felipe

---

Examinador : Anamélia Lorenzetti Bocca

---

Examinador: Maria Fátima Grossi de Sá

---

Examinador: Camila Guimarães de Freitas

---

Suplente: Rosangela Vieira de Andrade

# **DEDICATÓRIA**

**Dedico essa tese a Deus, Nossa Senhora, minha família, aos meus sobrinhos que nasceram durante o período, meus amigos e a todos que passaram pela minha vida nesses últimos quatro anos me dando apoio, palavras de conforto, força, otimismo e acreditando na minha capacidade.**

**“É fazendo que se aprende a fazer aquilo que se deve aprender a fazer”**

**Aristóteles**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus que é minha fortaleza e me conduz,

À Nossa Senhora que passa na frente dos meus caminhos,

À Santo Antônio que intercedeu por mim, concedendo-me várias graças nesse período,

Aos meus pais e minha irmã que são a base de tudo em minha vida e estiveram ao meu lado me dando suporte emocional, encorajando e incentivando com paciência, amor e conselhos,

Aos demais familiares pelo carinho e amizade,

À minha orientadora Maria Sueli, muito sábia e paciente, que me deu suporte para desenvolver meu trabalho,

Ao meu co-orientador André Nicola, que esteve ao meu lado durante o projeto aconselhando e ensinando a pensar e a me formar profissionalmente,

Ao meu orientador nos Estados Unidos Arturo Casadevall, que me concedeu a grande oportunidade de realizar experimentos durante um ano em outro país, vivenciando momentos únicos em minha vida,

Aos meus colaboradores no Butantã, fui recebida por um mês para obter novos conhecimentos e me capacitar,

Aos meus colaboradores do Laboratório da Universidade de Brasília, que contribuíram para o desenvolvimento do meu projeto com conhecimentos e experimentos,

Aos meus amigos e colegas de Laboratório, que compartilham alegrias e frustrações de experimentos com resultados positivos e negativos, comemorando quando possível e consolando quando necessário,

Aos meus amigos e colegas de trabalho do Exército Brasileiro, que estão todos os dias ao meu lado partilhando momentos e torcendo pela minha formação profissional,

Aos meus grandes amigos de vida, que estão ausentes na correria do dia a dia, mas sempre presente no coração, no carinho e na amizade, são aqueles que eu sei que posso contar a qualquer momento e que me propiciaram muitos momentos de alegria no período,

Ao Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular pela oportunidade e suporte recebido durante o processo,

Às Agências de Fomento CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro que possibilitou a realização da pesquisa.

## RESUMO

O aumento no número de pacientes imunocomprometidos no final do século XX acompanhou um crescimento na incidência de doenças oportunistas, com o surgimento de mais casos de indivíduos infectados por fungos patogênicos. Entre os patógenos relacionados a morbi-mortalidade dessas infecções, destaca-se o fungo *Candida albicans*. Este está presente no organismo humano de forma saprofítica, porém em situações de desequilíbrio microbiológico e imunológico, sofre dimorfismo e provoca invasão tecidual. Outro fungo é *Cryptococcus neoformans* também frequentemente encontrado no organismo e patogênico em pacientes imunocomprometidos ocasionando criptococose que na forma mais grave pode atingir o sistema nervoso e provocar meningoencefalite. Uma terceira micose que é importante destacar é a paracoccidioidomicose, que possui relevância clínica na América Latina e é causada por espécies do gênero *Paracoccidioides* sp. Está mais associada a um aspecto econômico-social, atingindo trabalhadores rurais provocando efeitos limitantes na qualidade de vida do paciente. Existem tratamentos com antifúngicos para essas três infecções, porém os fármacos disponíveis para o tratamento dessas doenças restringem-se a apenas alguns alvos celulares como parede, membrana e ácidos nucleicos; além de provocarem graves efeitos adversos e já terem sido associados a casos de resistência. Diante desse contexto, existe uma necessidade de descoberta de novos fármacos, e vários estudos recentes têm buscado abordagens terapêuticas que possam originar novas estratégias farmacológicas. Imunoterapias são técnicas mais atuais e promissoras para o tratamento de doenças infecciosas, porém ainda não estão disponíveis contra fungos patogênicos humanos. Esse projeto utilizou dados de um estudo de genômica comparativa realizado em nosso grupo de pesquisa que identificou a o gene *trr1* e seus produtos como um potencial alvo para novos antifúngicos. Baseado no interesse em desenvolver novas abordagens terapêuticas contra fungos patogênicos associado a crescente utilização de imunoterapia no tratamento de diversas doenças, a proteína Trr1, responsável por manter o equilíbrio redox da célula, foi analisada como alvo de estudo de anticorpos. Foram produzidas proteínas recombinantes de três espécies de fungos patogênicos, *C. albicans*, *C. neoformans* e *P. lutzii*, que foram utilizadas para a imunização de camundongos a fim de gerar anticorpos policlonais. Os animais foram imunizados de duas maneiras diferentes, 1) repetidas vezes apenas com a proteína de uma única espécie fúngica ou 2) com as proteínas das três espécies alternadamente. Durante o processo de imunização, os títulos

de anticorpos foram analisados contra os três tipos de proteínas, a fim de determinar a capacidade de reatividade cruzada dos anticorpos gerados. Os anticorpos policlonais foram utilizados para imunolocalização da proteína em cada uma das espécies. Por fim, linfócitos dos animais imunizados foram fusionados com células de mieloma para a geração de hibridomas e produção de anticorpos monoclonais. Alguns anticorpos foram capazes de se ligar a pelo menos uma proteína e serão alvo de estudos de caracterização em relação a toxicidade e capacidade de proteção a fim de analisar a potencialidade de tornarem-se uma nova abordagem terapêutica.

Palavras chave: tiorredoxina redutase, imunização, fungos, anticorpos, alvos moleculares.

## ABSTRACT

The increased number of immunocompromised patients by the end of the 20th century was followed by an incidence growth in opportunistic diseases, with the occurrence of more infected individuals by pathogenic fungi. Among the pathogens related to morbidity and mortality of these infections, the fungus *Candida albicans* should be mentioned. It is present in the human body as saprophytic, but it can occur situations of microbiological and immunological imbalance that cause a dimorphism resulting in tissue invasion. Another fungus is *Cryptococcus neoformans* often found in the body and pathogenic in immunocompromised patients causing cryptococcosis which in the most severe form can reach the nervous system and cause meningoencephalitis. A third ringworm that is important to highlight is paracoccidioidomycosis, that is relevant in Latin America and it is caused by the genus *Paracoccidioides* sp. This is more associated with an economic-social aspect, reaching rural workers and causing limiting effects on the quality of life of the patient. There are treatments targets for those diseases such as wall, membrane and nucleic acids; besides causing serious adverse effects and have already been associated with cases of resistance. In this context, there is a need for the discovery of new drugs, and several recent studies have been looking for new therapeutic targets that can lead to new pharmacological strategies. Immunotherapies are currently promising techniques for the treatment of diseases, but none has reached the market to treat human pathogenic fungi yet. This project used data from a comparative genomics study performed in our research group identifying the gene *trr1* and its products as a potential target for new antifungals. Based on the interest in the development of new therapeutic approaches against pathogenic fungi associated to the increasing use of the immunotherapy for the treatment of several diseases, the Trr1 protein, responsible for maintaining the redox balance of the cell, was analyzed as a target for antibody study. Recombinant proteins from three pathogenic fungal species, *C. albicans*, *C. neoformans* and *P. lutzii*, were used to immunize mice to generate polyclonal antibodies. The animals were immunized by two different ways, 1) several times with the protein of a single fungal species or 2) with the proteins of the three species sequentially. During the immunization process, all antibody titers were analyzed against the three types of proteins to check for cross reactivity. Polyclonal antibodies were used to immunolocalize the protein in each species. Finally, lymphocytes from immunized animals were also fused with myeloma cells for hybridoma generation and monoclonal antibody production. Some antibodies

were able to bind to at least one protein and will be target of characterization studies regarding toxicity and protection ability in order to analyze the ability of becoming a novel therapeutic approach.

Key words: thioredoxin reductase, immunization, fungi, antibodies, molecular target.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
BSA	Albumina de soro bovino
Células Th	Células T helper
CAMP	Adenosina 3'5'-monofosfato cíclico
CLSI	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DIC	Contraste diferencial de interferência
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenoamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
Erg6	24-esterol-metiltransferase
Erg3	C5 esterol desaturase
Erg11	14 esterol demetilase
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing</i>
Fab	Fragment antigen-binding
Fc	Cristal Fraction
FDA	<i>Food and Drug Administration's</i>
GalGXM	Galactoxilomanana

GMP	Guanosina monofosfato
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
Gp43	Glicoproteína de 43 kDa
GXM	Glicuroxilomanana
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HT	Hipoxantina Timina
Hsp90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosideo
kDa	Quilo Dalton
LB	Luria Bertani
mAb	Anticorpo Monoclonal
MAT	<i>Mating Type</i>
MIC	Concentração Mínima Inibitória (CMI)
MOPS	Ácido 3-morfolinopropanosulfônico
$\mu\text{m}$	Micrômetro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OD	Optic Density (densidade óptica)
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
pB	Pair bases (pares de base)

PBS	Tampão fosfato-salino
Q.S.P	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAP	<i>Secreted aspartic proteinases</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SGD	<i>Saccharomyces genome database</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SOB	<i>Super Optimal Broth</i> (meio super ideal)
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> (meio super ideal com glicose)
TEB	Tampão Tris-Borato-EDTA
Trr1	Tiorredoxina redutase
YPD	<i>Yeast extract – peptone - dextrose</i>

---

<sup>1</sup> Considerações sobre os nomes de genes e proteínas: a utilização da fonte varia de acordo com a espécie.

*Candida albicans*: GENE – TRR1 / PROTEÍNA – Trr1

*Cryptococcus neoformans*: GENE – TRR1 / PROTEÍNA – Trr1

*Paracoccidioides lutzii*: GENE – trr1/ PROTEÍNA – Trr1

Para fins de padronização, na tese foi utilizado: GENE – TRR1 / PROTEÍNA – Trr1

## Lista de Figuras

Figura 1	Filogenia de fungos patogênicos humanos.	17
Figura 2	Impacto causado por fungos patogênicos no número de internações por pacientes	18
Figura 3	Áreas geográficas de distribuição de infecções por <i>Paracoccidioides</i> .	19
Figura 4	Estrutura da parede celular de um fungo patogênico.	20
Figura 5	Diferentes morfologias do fungo <i>C. albicans</i>	23
Figura 6	Mecanismo de infecção do fungo <i>C. albicans</i> e interação com o hospedeiro	25
Figura 7	Ciclo de vida e infecção do fungo <i>C. neoformans</i> .	27
Figura 8	Morfologias encontradas em células de <i>C. neoformans</i>	27
Figura 9	Ciclo de vida dos fungos do gênero <i>Paracoccidioides</i> .	30
Figura 10	Mecanismos de resistência dos fungos contra os azóis	38
Figura 11	Reação catalítica do sistema de Tiorredoxina.	51
Figura 12	Vetor pET21a(+) e seus sítios de restrição	59
Figura 13	Alinhamento entre as sequências de Trr1 de diferentes espécies de fungos	77
Figura 14	Digestão dos plasmídeos obtidos após transformação dos genes em DH5 $\alpha$	79
Figura 15	Expressão, indução, otimização e purificação de Trr1 de <i>C. neoformans</i> em diferentes tempos de indução e concentração de IPTG.	80
Figura 16	Expressão, indução, otimização e purificação de Trr1 de <i>C. albicans</i> em diferentes tempos de indução e concentração de IPTG.	81
Figura 17	Expressão, indução, otimização e purificação de Trr1 de <i>P. lutzii</i> em diferentes tempos de indução e concentração de IPTG.	82
Figura 18	Proteínas de Trr1 dos três fungos após purificação.	83
Figura 19	Camundongos imunizados apenas com Trr1 de <i>C. neoformans</i>	85
Figura 20	Camundongos imunizados apenas com Trr1 de <i>C. albicans</i>	86
Figura 21	Camundongos imunizados apenas com Trr1 de <i>P. lutzii</i>	87

Figura 22	Camundongos imunizados com a Trr1 de todos os três fungos	<b>88</b>
Figura 23	Imunocitocalização de Trr1 em leveduras de <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> .	<b>89</b>
Figura 24	Análise do extrato protéico do citosol (C) e superfície celular (S) dos fungos	<b>91</b>
Figura 25	Expansão clonal pode ocasionar clones não viáveis	<b>92</b>

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1	Principal Classificação dos antifúngicos utilizados para o tratamento de micoses	<b>33</b>
Tabela 2	Modelo de um dos esquemas terapêuticos padronizados para as infecções fúngicas	<b>35</b>
Tabela 3:	Alvos moleculares identificados por genômica comparativa potenciais para fármacos antifúngicos.	<b>43</b>
Tabela 4	Linhagens de células utilizadas no trabalho	<b>58</b>
Tabela 5	Concentração de IPTG para cada proteína	<b>68</b>
Tabela 6	Composição de um gel de poliacrilamida	<b>69</b>
Tabela 7	Coefficiente de extinção e massa molecular de cada uma das proteínas	<b>70</b>
Tabela 8	Similaridade das proteínas de Trr1 de fungos de diferentes espécies	<b>78</b>
Tabela 9	Títulos de anticorpos obtidos contra as proteínas Trr1 dos fungos após imunização	<b>84</b>

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Contexto atual de infecções fúngicas</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Características dos fungos</b>	<b>16</b>
<b>1.3 <i>Candida albicans</i></b>	<b>22</b>
<b>1.4 <i>Cryptococcus neoformans</i></b>	<b>25</b>
<b>1.5 <i>Paracoccidioides lutzii</i></b>	<b>29</b>
<b>1.6 Fármacos antifúngicos utilizados na clínica</b>	<b>31</b>
<b>1.7 Limitações dos fármacos antifúngicos atuais</b>	<b>36</b>
<b>1.8 Busca por novas estratégias terapêuticas</b>	<b>40</b>
<b>1.9 Imunoterapia de doenças infecciosas</b>	<b>46</b>
<b>1.10 Tiorredoxina Redutase (Trr1)</b>	<b>50</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>54</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>56</b>
<b>4. ESQUEMA DO PROJETO</b>	<b>57</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>58</b>
<b>5.1 Linhagens de células</b>	<b>58</b>
<b>5.2 Vetor de expressão</b>	<b>59</b>
<b>5.3 Meios de Cultura</b>	<b>60</b>
<b>5.4 Soluções e tampões</b>	<b>62</b>
<b>5.5 Desenho dos genes para produção de proteínas recombinants de Trr1</b>	<b>66</b>
<b>5.6 Síntese dos genes alvo</b>	<b>66</b>
<b>5.7 Geração de células eletrocompetentes e transformação por eletroporação</b>	<b>67</b>
<b>5.8 Indução e purificação de proteínas</b>	<b>67</b>
<b>5.9 Verificação da expressão e purificação de proteínas em gel de poliacrilamida</b>	<b>69</b>
<b>5.10 Concentração das proteínas e quantificação</b>	<b>70</b>

5.11	Imunização dos Camundongos	70
5.12	ELISA	71
5.13	Obtenção de Híbridomas	72
5.14	Obtenção dos Extratos Proteicos	73
5.15	Aspectos Éticos	74
5.16	<i>Western Blot</i>	75
6.	RESULTADOS	76
6.1	Análise das sequências de Trr1 de fungos patogênicos	76
6.2	Obtenção dos vetores de expressão dos genes das proteínas alvo	78
6.3	Expressão heteróloga de Trr1 em <i>E. coli</i> e purificação das proteínas recombinantes	79
6.4	Imunização dos animais e reação cruzada	83
6.5	Imunocitocalização com os soros policlonais	89
6.6	Confirmação da ligação dos anticorpos por <i>Western Blot</i>	90
6.7	Geração de Anticorpos Monoclonais	91
7.	DISCUSSÃO	94
8.	CONCLUSÃO	99
9.	PERSPECTIVAS	100
	REFERÊNCIAS	102

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Contexto atual de infecções fúngicas

A identificação de infecções por fungos patogênicos ao longo dos últimos anos apresentou um relevante crescimento na incidência de morbi-mortalidade principalmente em pacientes com alguma imunodeficiência. A falha terapêutica ocasionada por fármacos tóxicos, cepas resistentes e abandono de tratamento por serem longos, entre outros motivos, são fatores que resultam na necessidade de busca de novas estratégias terapêuticas, mais eficazes e seguras, para o tratamento dessas infecções (Cassone e Casadevall, 2012). Nas últimas décadas, a imunoterapia ganhou destaque em algumas comorbidades, como câncer, esclerose múltipla e outras doenças inflamatórias, mas ainda foi restrito a doenças infecciosas tendo poucos anticorpos monoclonais aprovados para esse uso, como na prevenção da infecção pelo vírus sincicial respiratório, o Palivizumab (Reichert, 2011).

Pouco foi realizado em relação a infecções fúngicas possivelmente devido à negligência em relação a magnitude do impacto provocado na saúde humana e sua respectiva incidência, a baixa qualidade técnica na transferência da produção em pequena escala de pesquisas para industrial, bem como o alto custo com os estudos toxicológicos e de fases clínicas, sendo que apenas a Fase I de estudo clínico de uma droga corresponde a um gasto de cerca de 3 a 4 milhões de dólares (Edwards, 2012). No entanto, observa-se que o número de estudos com anticorpos monoclonais para o tratamento de várias doenças tem aumentado a cada ano, sendo 7 anticorpos monoclonais aprovados para uso terapêutico no ano de 2016 e cerca de 50 estudos investigacionais foram realizados apenas no ano de 2017. Entre os mAbs dois deles atuam em doenças provocadas por microrganismos, *Clostridium difficile* e *Bacillus anthracis* (Reichert, 2017).

A abordagem imunoterapêutica mais utilizada e mais difundida é a utilização de vacinas como estratégia de prevenção de inúmeras doenças infecciosas. A primeira vacina segura e eficaz foi desenvolvida contra a varíola há mais de dois séculos, antes mesmo da identificação de muitos patógenos fúngicos e o desenvolvimento de fármacos contra essas infecções ocorreu no século XX (Cassone e Casadevall, 2012). No entanto, mais de cinquenta anos após o primeiro antifúngico, poucas classes diferentes desses fármacos foram desenvolvidas e tornaram-se disponíveis para uso terapêutico sendo que nenhuma vacina ou qualquer imunoterapia ainda hoje está em uso clínico para pacientes com micoses sistêmicas (Edwards *et al.*, 2018). O tratamento clínico de um paciente

com infecção invasiva deve ser analisado observando seu estado imunológico. Existe um paradigma de tratamento entre indivíduos imunocomprometidos e simultaneamente infectados, pois estes normalmente apresentam alta carga fúngica acompanhada de baixa inflamação. É necessário que o paciente tenha sua resposta imunológica restaurada a fim de combater a infecção com a produção de células de defesa, porém o excesso de reação também é desvantajoso por desencadear um processo inflamatório que caso não seja monitorado pode ser intenso e causar a morte do paciente (Perfect e Bicanic, 2015). Parte do agravamento e número de mortes associada a candidemia está relacionado ao tratamento inadequado por retardo no início do esquema terapêutico, falta de identificação do patógeno com a consequente utilização de fármacos sem ação devido a mecanismos de resistência do patógeno ou até mesmo o uso de doses inadequadas para aquele tipo de infecção (Pfaller e Diekema, 2007).

Atualmente há um maior interesse na investigação de imunoterapia nessas micoses devido a um conjunto de fatores, como o progresso tecnológico que contribui no desenvolvimento de melhores imunógenos e mais protetores (Cassone e Casadevall, 2012). O conceito de vacina em doenças antifúngicas extrapola a ideia de prevenir a infecção e abrange o conceito de utilizá-la como tratamento em monoterapia ou adjuvante a um fármaco antifúngico aumentando sua eficácia e reduzindo os efeitos nocivos. O uso dessa metodologia pode envolver aplicação de células inativadas, mutantes atenuados ou até mesmo de subunidades dos microrganismos (Cassone e Casadevall, 2012). No entanto, um desafio na aplicação dessa técnica é determinar o momento ideal do início da intervenção já que muitas dessas infecções estão relacionadas a pacientes imunocomprometidos e com outras condições clínicas limitantes e, a imunoterapia, por atuar diretamente no sistema imunológico, pode tanto agravar a doença estimulando a inflamação como ainda pode apresentar uma baixa resposta devido à dificuldade no recrutamento de células imunes. O desenvolvimento de vacinas pode ser dividido entre aquelas profiláticas, que seriam utilizadas antes mesmo da infecção em pacientes suscetíveis e aquelas terapêuticas, utilizadas já no tratamento complementando uma terapia com outras fármacos antifúngicos (Nicola *et al.*, 2018).

Nos últimos 15 anos, a proteína Als3 demonstrou-se um alvo molecular bastante promissor para ser utilizado como uma vacina, sendo foco de muitos estudos. Foram testadas diferentes doses de antígenos, sendo a mais alta 10x maior que a mais baixa, e todas protegeram os camundongos contra a infecção por *Cândida*, porém apenas a dose mais baixa estimulou resposta Th1, concluindo-se que o título de anticorpos não se relacionava a proteção da vacina (Ibrahim *et al.*,

2005). Foi ainda observado proteção contra *Staphylococcus aureus*, além da *Candida albicans* através do recrutamento de fagócitos e produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-13, IL-10 (Lin *et al.*, 2009). Essa vacina foi estudada como profilática, que normalmente apresenta resultados positivos para organismos imunocompetentes, porém sem expectativas para imunocomprometidos, porém Als3A foi capaz de demonstrar eficácia tanto em animais saudáveis quanto naqueles imunocomprometidos com neutropenia, utilizando a dose que se relacionava a ativação de Th1 (Spellberg *et al.*, 2005; Nicola *et al.*, 2018). Essa mesma resposta Th1 foi observada em vacinas terapêuticas utilizando células dendríticas primadas com o peptídeo P-10 de *Paracoccidioides*, resultando em respostas protetoras contra o fungo (Silva *et al.*, 2017). O mesmo peptídeo já demonstrou resultados promissores também como vacina de DNA profilática ou terapêutica, nesse último caso, sendo capaz de erradicar a infecção nos pulmões de camundongos infectados (Rittner *et al.*, 2012). No caso da vacina de Sap2 contra *Candida*, a proteção relacionou-se ao título de anticorpos produzidos pelo animal, obtendo maior proteção em maiores titulações (Vilanova *et al.*, 2004).

A utilização de anticorpos monoclonais na imunoterapia é uma estratégia mais nova e demonstra ser vantajosa por apresentar um efeito protetor logo após a administração por diversos mecanismos, como a opsonização, neutralização, fagocitose clássica e ativação do complemento, além de outros efeitos, não clássicos, como a ligação direta ao alvo dos mAbs desenvolvidos contra, podendo atuar diretamente como fungicida ou fungistático, o que não é muito comum (Casadevall e Pirofski, 2007; Cassone e Rappuoli, 2010). Os mecanismos de proteção de anticorpos monoclonais classificados como antifúngicos podem ser capazes de provocar efeitos diretos no alvo molecular, atuar por imuno-modulação ou alterando a resposta imunológica do hospedeiro, e, por fim, esses anticorpos podem ser capazes de neutralizar toxinas liberadas por esses patógenos (Nicola *et al.*, 2018). Acredita-se que anticorpos capazes de bloquear a adesão dos patógenos estão mais associados a uma ação e eficácia contra doenças da mucosa, enquanto anticorpos que medeiam proteção pelo aumento da fagocitose de células efetoras possam apresentar melhor resposta contra as infecções sistêmicas (Casadevall e Pirofski, 2007). Os anticorpos monoclonais por atuarem diretamente na resposta contra o patógeno, não necessitam da cascata de ativação da imunidade com produção de células de células T do sistema imunológico do paciente para que apresentem efeito, resultando em um mecanismo mais rápido contra o patógeno, e ainda, no caso de indivíduos com baixa quantidade de células CD4+, como em

infecções com HIV, os pacientes ainda podem apresentar uma boa perspectiva no tratamento com anticorpos monoclonais, favorecendo o sucesso da terapia (Medici e Del Poeta, 2015).

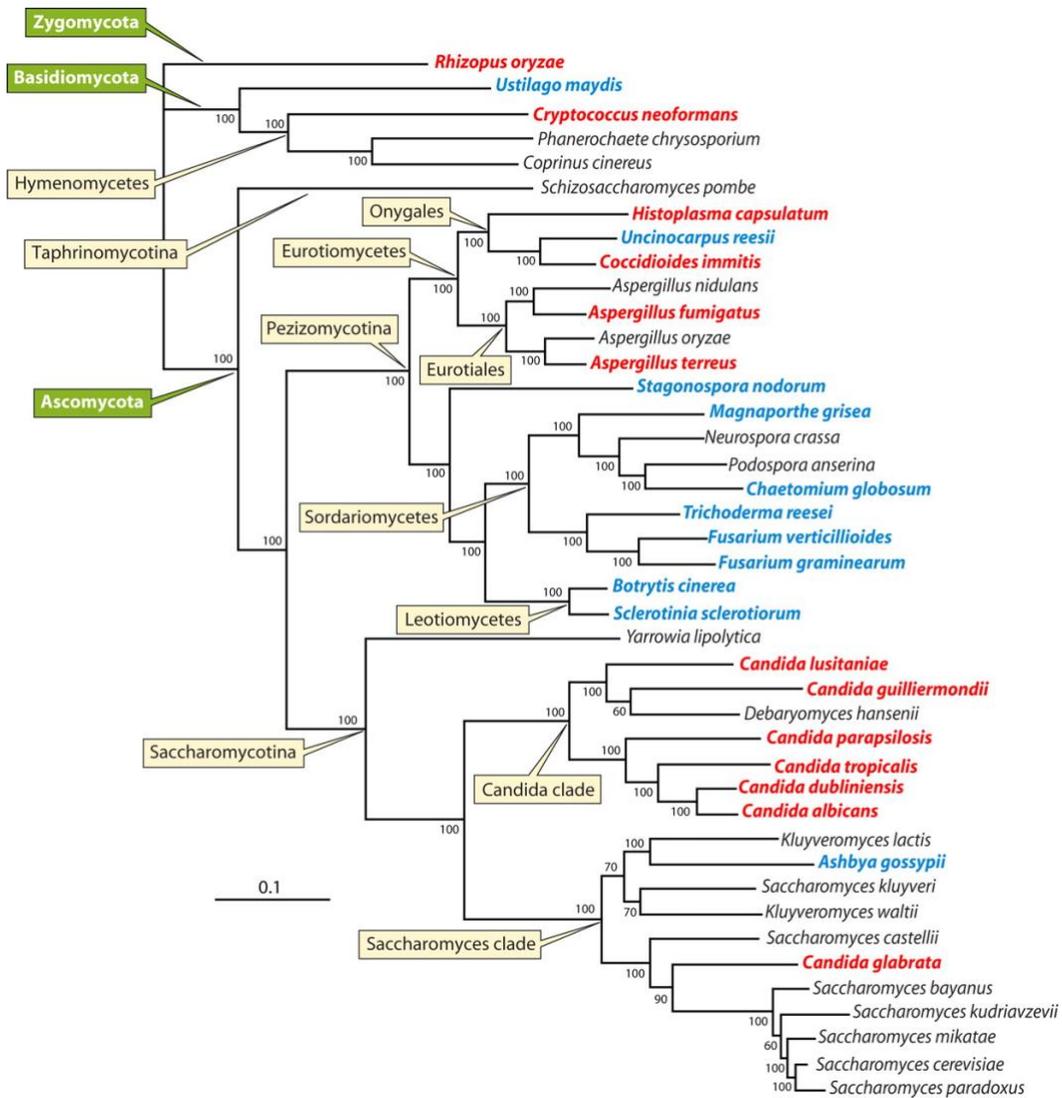
Um fator importante em doenças infecciosas é que muitas já começam a ser tratadas através do exame clínico sem o resultado de exames laboratoriais ou identificação do patógeno, o que resulta na escolha de fármacos de amplo espectro ou que não sejam eficazes naquele caso específico. Estudos com mAbs muitas vezes se restringem a alvos específicos de determinados patógenos, o que idealmente requer um diagnóstico específico e diferencial da doença para a escolha do tratamento (Saylor *et al.*, 2009). No entanto é importante ressaltar que os mAbs são mais efetivos quando utilizados no início da infecção e uma identificação do patógeno pode demorar um tempo considerável em que seja necessário já iniciar uma terapia medicamentosa. Em *C. neoformans*, já foram identificados anticorpos específicos capazes modular o metabolismo do fungo e alterar a sua respectiva infecção (McClelland *et al.*, 2010). O que observa-se nos estudos com anticorpos, é que participação destes no processo de infecção e invasão tecidual do patógeno é variável e controversa, porém a ausência de IgM na infecção de por *C. neoformans* provocou uma maior patogenicidade (Subramaniam *et al.*, 2010). Dessa forma os anticorpos podem atuar modulando a imunidade do hospedeiro conferindo proteção e evitando o estabelecimento da infecção.

## 1.2 Características dos fungos

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, que se alimentam através de nutrientes moleculares externos. Vivem através de relações simbióticas, comensais ou patogênicas com plantas, animais e humanos, podendo ocasionar infecções agudas, crônicas, disseminadas ou recorrentes nesses últimos hospedeiros (Hube, 2009). Esses organismos são encontrados no meio ambiente, em geral, na forma de levedura ou na forma de micélio, alguns deles sendo capazes de variar seu aspecto morfológico de acordo com as condições ambientais (Shahid, 2016).

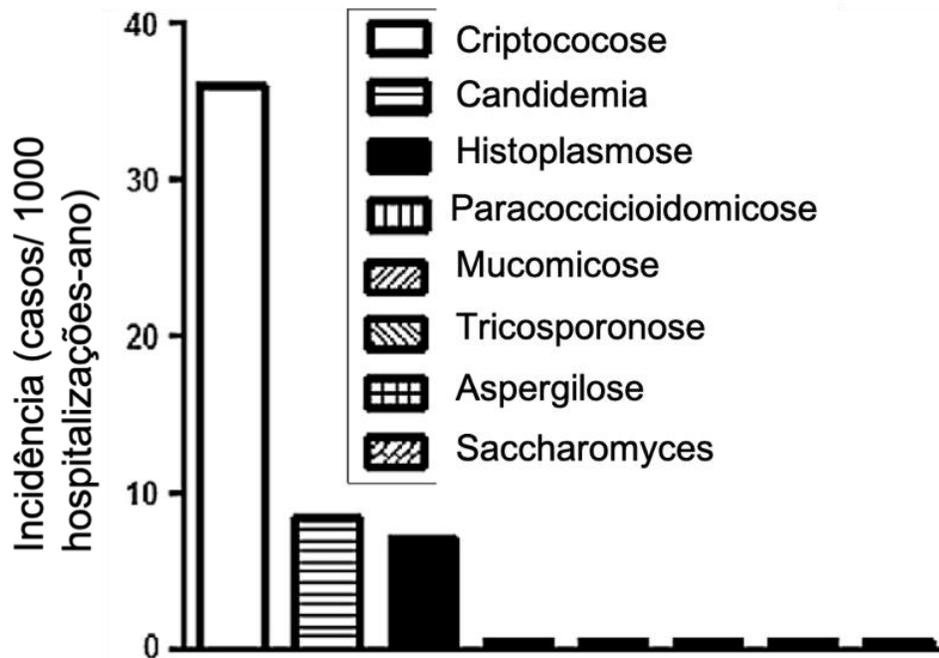
Estima-se que exista cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos no mundo, sendo descritos 6 mil patógenos de plantas e entre 150 a 400 espécies fungos patogênicos humanos. Em geral são encontrados no meio ambiente sem provocar infecção (Wächtler *et al.*, 2011). A *Candida albicans*, por exemplo, é encontrada no próprio organismo humano em uma relação comensal, porém, em determinadas situações de desequilíbrio do meio pode tornar-se um patógeno oportunista. A maioria dos fungos patogênicos que provocam micoses em humanos pertencem aos

filos *Basidiomycota* e *Ascomycota*, que se divergiram ao longo de milhares de anos em diferentes espécies de patógenos de relevância clínica (**Figura 1**), destacando-se devido à alta morbimortalidade, o *Cryptococcus neoformans*, encontrado em pacientes imunocomprometidos em todo o mundo, além da própria *C. albicans*. Ambos os fungos são os principais responsáveis por infecções fúngicas em pacientes hospitalizados e com algum tipo de supressão imunológica, resultando em mais de 30 mil casos por ano de pacientes com *C. neoformans*. (**Figura 2**).

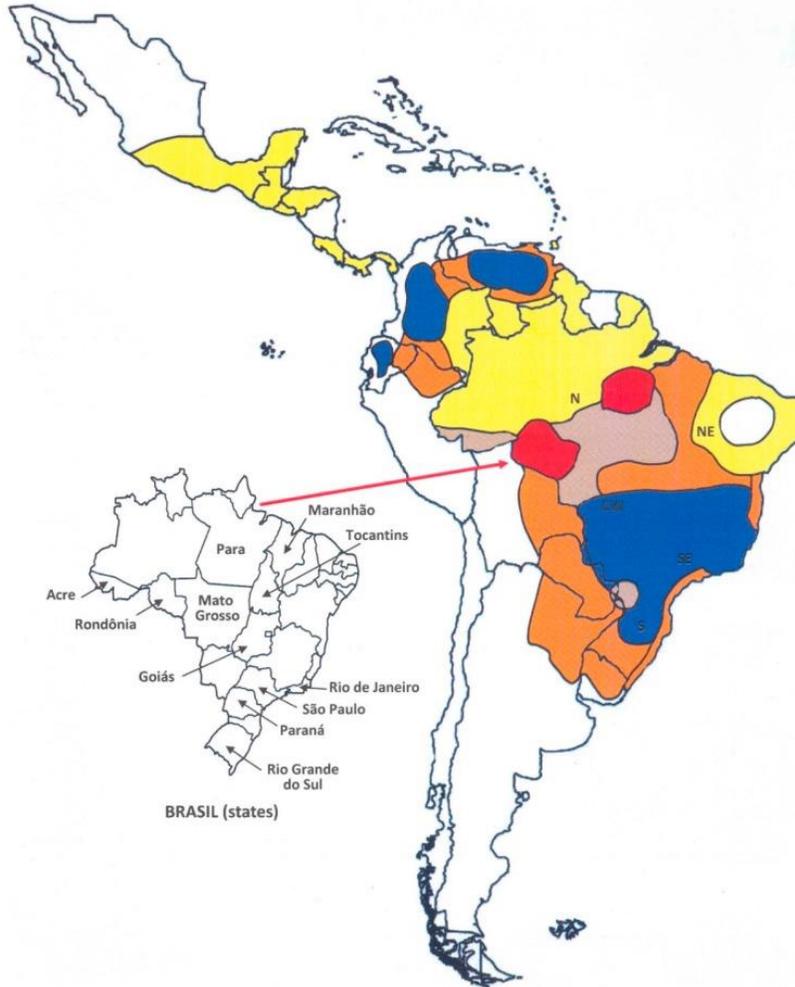


**Figura 1: Filogenia de fungos patogênicos humanos.** Os fungos patogênicos apresentam características distintas, porém se originam de um ancestral comum que ao longo do tempo sofreu evoluções originando diferentes filas espécies patogênicas, de plantas (em azul) e humanos (em vermelho) (Butler, 2010).

Fungos do gênero *Paracoccidioides*, *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, são encontrados em indivíduos saudáveis, porém em populações mais específicas das regiões endêmicas variando de 4 a 40 casos a cada 100 mil habitantes dependendo do município e provocando 3 a 5% de letalidade ao ano em seus pacientes. Entre os anos de 1996 e 2006, o número de mortes provocadas pela paracoccidioidomicose representou 51% do total de infecções fúngicas e com o passar dos anos, os *Paracoccidioides* têm sido identificados em mais locais na América Latina, como observa-se na **Figura 3** (Medici e Del Poeta, 2015; Martinez, 2017).



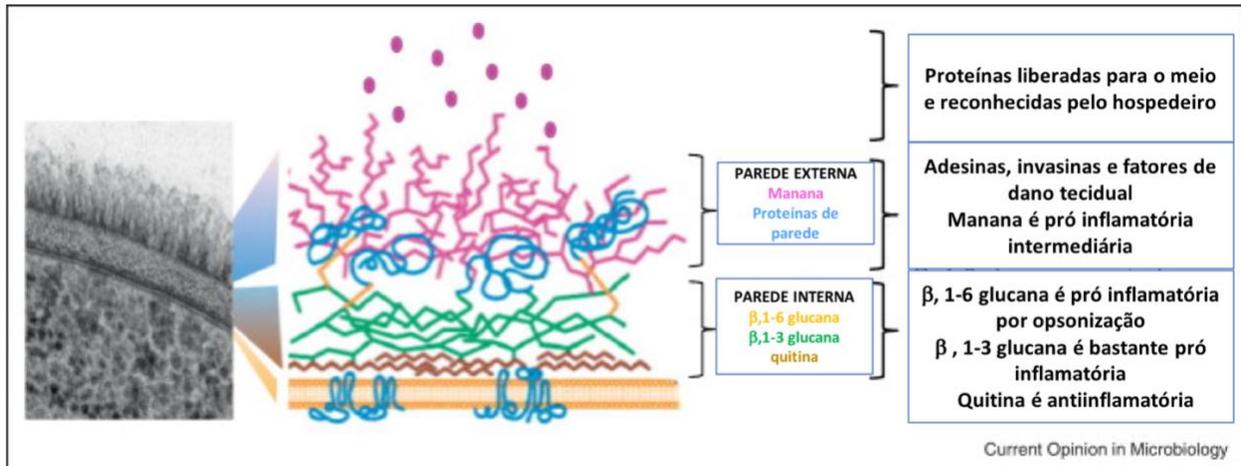
**Figura 2: Impacto causado por fungos patogênicos no número de internações por pacientes.** Estudo realizado em um hospital brasileiro identificou as principais micoses que provocaram hospitalização nos pacientes durante um ano e sua respectiva incidência. Criptococose e candidemia foram as infecções com maior incidência do hospital no período de um analisado (De Oliveira *et al.*, 2014).



**Figura 3: Áreas geográficas de distribuição de infecções por *Paracoccidioides*.** As regiões foram marcadas de acordo com a endemicidade identificando a expansão da paracoccidioidomicose na América Latina. **Primeiras áreas de endemicidade**, **alta endemicidade desde as últimas décadas do século XX**, **recente evidência de aumento de endemicidade**, **moderada endemicidade**, **baixa endemicidade**, áreas sem casos ou raros (Martinez, 2017).

Os fungos possuem como característica a presença de parede celular em sua composição, garantindo maior proteção para suas células e favorecendo a sobrevivência em diversas condições ambientais, atuando como uma barreira física de proteção a lesões mecânicas, moléculas prejudiciais e lise osmótica (Shahid, 2016). Além disso, é a estrutura que entra em contato direto com o meio externo e, conseqüentemente, a resposta imunológica do hospedeiro (Gow e Hube, 2012). A parede celular dos fungos é composta principalmente por carboidratos e proteínas, sendo os principais polissacarídeos da parede celular as mananas, glicanas e quitinas (**Figura 4**). A quitina e a  $\beta$ -1,3 glucana fazem parte da camada interna da parede celular fortificando e garantindo o formato e estrutura da parede celular e sua quantidade varia de acordo com as formas infecciosas

dos patógenos. Já as mananas são encontradas em aspecto fibrilar na parte externa da parede celular de forma menos estruturada, apresentam baixa permeabilidade e porosidade, afetando a resistência da parede ao ataque das moléculas do hospedeiro e a entrada de fármacos antifúngicos no interior da célula (Gow e Hube, 2012). Essa estrutura nos últimos anos foi alvo de estudos que resultaram em uma nova classe de antifúngicos que atuam em seus compostos, as equinocandinas.



**Figura 4: Estrutura da parede celular de um fungo patogênico.** Os fungos apresentam a parede celular como a estrutura de primeiro contato do hospedeiro com o patógeno. Dessa forma, seus componentes que são carboidratos e proteínas atuam como antígenos mediadores da resposta imunológica. A parede celular acima pertence à *C. albicans*, sendo composta por 90% de carboidratos e 10% de proteína, porém pode variar entre os diferentes fungos.

Adaptado de (Gow e Hube, 2012).

No decorrer das últimas décadas do século XX, foram desenvolvidos fármacos antifúngicos de diferentes classes disponíveis para o tratamento dessas doenças. Entretanto, o tratamento antifúngico é, muitas vezes, dificultado pelos efeitos adversos que são provocados nos pacientes em terapia, além da identificação de cepas resistentes (Jensen-Pergakes *et al.*, 1998). A resposta imunológica do organismo do hospedeiro frente a infecção fúngica é um fator que influencia o tratamento, já que a resposta pode ser insuficiente a ponto de agravar a infecção ou exacerbada intensificando a inflamação, portanto existe uma chance maior de um tratamento eficaz quando o sistema imunológico do paciente reage de forma equilibrada e moderada sendo capaz de realizar a modulação da resposta imune controlando a infecção (Poulain, 2015).

A primeira proteção do organismo frente ao patógeno é composta por barreiras físicas, como mucosas e superfícies epiteliais. Após ultrapassar essas barreiras o organismo tenta eliminar

o patógeno por mecanismos da imunidade inata, que é composta pelo sistema complemento e fagócitos, que são produtores de citocinas capazes de realizar a maturação de células T CD4+, ativando a imunidade adaptativa (Medici e Del Poeta, 2015). O reconhecimento do patógeno por receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) por meio do sistema complemento é a primeira defesa do organismo após a invasão pelo patógeno (Poulain, 2015). Esses padrões são processados por células dendríticas e apresentados para a ativação da resposta imunológica, na qual ocorre o recrutamento de células de defesa, neutrófilos, macrófagos e monócitos (Shahid, 2016). As diferentes citocinas expressas por células dendríticas e macrófagos em resposta a invasão do patógeno provocam a diferenciação dos linfócitos T CD4+ (Medici e Del Poeta, 2015; Shahid, 2016).

Estudos acerca de patógenos humanos devem ser realizados devido ao impacto na saúde que suas doenças causam. Além disso, ainda há muito a ser elucidado acerca do assunto, já que com o passar dos anos estão sendo descobertas novas espécies, suas manifestações clínicas e prognósticos. A falha no tratamento é uma preocupação importante e incentiva a busca por novas alternativas terapêuticas (Del Poeta e Casadevall, 2012; Teixeira, M. E. M. *et al.*, 2014). Apesar de novos fármacos antifúngicos ainda não terem chegado ao uso clínico, nos últimos anos muitos estudos promissores foram realizados para que em um futuro próximo novas abordagens terapêuticas no tratamento de micoses atinjam o mercado e possam ser amplamente utilizadas com eficácia e segurança. A pesquisa e o desenvolvimento de novas terapias baseou-se em estratégias diversificadas para a obtenção de novos alvos antifúngicos, desde o desenvolvimento de novos fármacos contra os alvos já clássicos, como novas moléculas atuando contra o Er611, alvo dos azóis; até a descoberta de novas moléculas em novos alvos e vias; o estudo de genes essenciais; o desenho racional de novos fármacos ou o uso de outros já conhecidos em doenças diferentes daquelas a qual foram previamente utilizados, o que foi denominado “reposição de fármacos”; além de técnicas de imunoterapias como uso de anticorpos monoclonais, vacinas e terapia com citocinas (Nicola *et al.*, 2018).

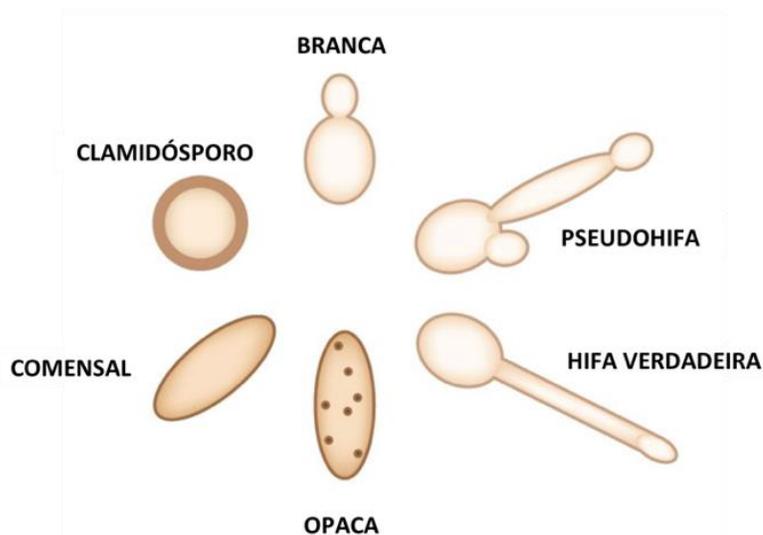
### 1.3 *Candida albicans*

O gênero *Candida* pertence ao filo Ascomycota e possui mais de duzentas espécies, sendo um dos principais causadores de micoses oportunistas no mundo (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Entre essas espécies, algumas são patógenos humanos que causam desde micoses superficiais até sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, destacando a *C. albicans* (Clark *et al.*, 1996). A doença denominada candidíase invasiva durante muitos anos foi associada a uma única espécie, porém mais de dezessete espécies já foram reportadas por causarem esse tipo de infecção em humanos, sendo que 90% dos casos estão relacionados aos fungos *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e *C. krusei* e os outros 10% às demais espécies de *Candida* já identificadas (Pfaller e Diekema, 2007). Na última década, o custo de pacientes com candidíase invasiva resultou em gastos de cerca de US \$ 300 milhões por ano em saúde nos Estados Unidos (Sanguinetti *et al.*, 2015).

Inicialmente, cada espécie de *Candida* estava relacionada a um perfil de infecção, por exemplo, *C. glabrata* era mais associada a doenças em idosos, enquanto *C. parapsilosis*, em bebês até 1 anos de idade (Turner e Butler, 2014). No entanto, a epidemiologia da doença, mudou ao longo dos anos com a melhoria na identificação das espécies observando o aumento de infecções causadas por espécies *Candida* não *albicans*, devido ao surgimento de patógenos mais resistentes à terapia antifúngica utilizada. A incidência relacionada a esses patógenos é de cerca de 63 mil infecções resultando em 0,4 mortes a cada 100 mil habitantes por ano (Pfaller e Diekema, 2007; Sanguinetti *et al.*, 2015).

A *C. albicans* possui diversas estratégias para sobrevivência no hospedeiro, como flexibilidade morfológica (**Figura 5**); que envolve a mudança da forma branca, que é mais arredondada, para a forma opaca, que é mais alongada; acasalamento; filamentação induzida por contato com diferentes tipos de superfície; expressão de adesinas associada a hifas; invasão de células hospedeiras induzidas por endocitose com a participação de invasinas ou penetração ativa; liberação de enzimas hidrolíticas, principalmente proteases, fosfolipases e lipases; obtenção de nutrientes das células hospedeiras; resposta ao estresse; e modificação do fagossomo para promover o crescimento da hifa (Polke *et al.*, 2015; Chin *et al.*, 2016). As células leveduriformes parecem estar relacionadas ao pH baixo do ambiente e alta densidade celular provocando o processo de disseminação no tanto no meio ambiente e quanto na corrente sanguínea, enquanto as hifas participam do processo de invasão e dano tecidual, presença de soro, temperatura fisiológica,

CO<sub>2</sub>, baixas densidades celulares (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Pukkila-Worley *et al.*, 2009). As hifas quando são formadas nas células fagocíticas são capazes de perfurar a célula imune do hospedeiro por forças mecânicas e podem permitir a invasão do fungo e sua disseminação.



**Figura 5: Diferentes morfologias do fungo *C. albicans*.** O fungo *C. albicans* pode ser encontrado em diferentes morfologias de acordo com seu ciclo de vida e estado infeccioso. A célula quando vive de forma comensal pode ser encontrada na forma ovalada ou na forma branca que é mais arredonda, alterando para células mais instáveis opacas dependendo da condição ambiental ou iniciar um processo de formação de pseudohifas quando originam brotamentos. Devido a alterações ambientais, pode ocorrer a transição morfológica de leveduras para hifas que irão provocar invasão tecidual. Clamidósporos são células de armazenamento de nutrientes encontradas em algumas condições ambientais (Gow, 2013).

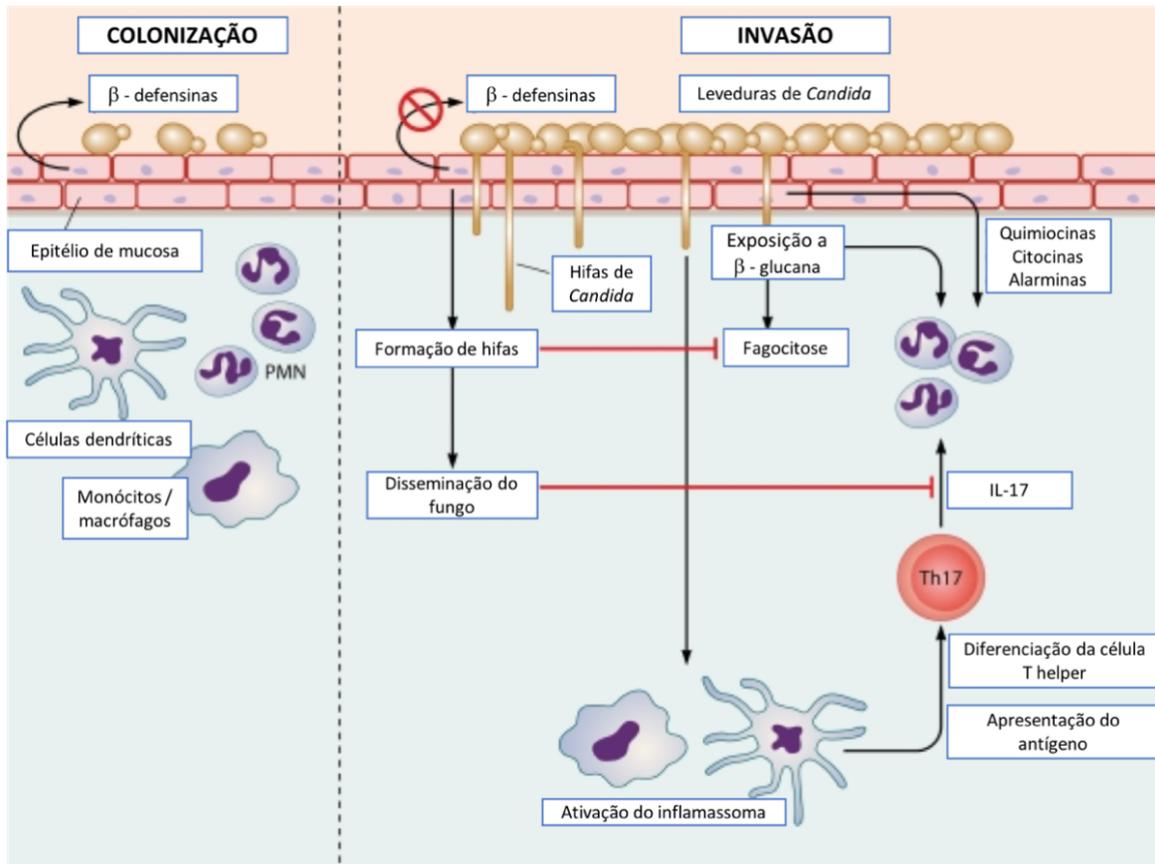
O fungo possui a capacidade de modular rapidamente a sua estrutura de parede celular que interage com o sistema imunológico através de processos de glicosilação, expressão diferencial de moléculas durante o ciclo celular e morfogênese, o que afeta os mecanismos de defesa do hospedeiro (Poulain, 2015). Além disso, forma biofilmes complexos em substratos compostos por uma mistura de leveduras que se aderem ao substrato e hifas na parte superior recobertas por uma matriz fibrosa contendo muitas bombas de efluxo de fármacos. Os biofilmes normalmente dificultam o tratamento devido à resistência a antifúngicos e por afetar a resposta imune resultando em uma maior patogenicidade (Mayer *et al.*, 2013).

Essa espécie é naturalmente encontrada no organismo de indivíduos saudáveis em diversas partes do corpo, como a boca, fazendo parte da microbiota dos seres humanos, no qual vivem por

uma relação de comensalismo (Gow e Hube, 2012). A candidíase ocorre devido a um desequilíbrio entre a imunidade do hospedeiro e a capacidade oportunista do fungo, sendo dependente tanto do sistema imunológico quanto de sua habilidade em se adaptar a novos nichos (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). As infecções por *Candida sp.* podem ser superficiais atingindo a cavidade oral, faringe, esôfago e mucosa vulvovaginal ou disseminadas caracterizando a candidíase invasiva sistêmica que apresenta alta taxa de mortalidade em pacientes internados e pode atingir qualquer órgão do hospedeiro, que são ambientes com diferentes características de temperatura, pH e outras condições de sobrevivência, aos quais o fungo possui habilidade de se adaptar (Mayer *et al.*, 2013).

A expressão gênica varia com a morfogênese do fungo e está bastante relacionada à sua patogenicidade, uma vez que alterações ambientais provocam mudanças na forma fúngica e o início do processo infeccioso com invasão dos tecidos do hospedeiro (Mayer *et al.*, 2013). As condições imunológicas e fisiológicas dos indivíduos também predisõem à infecção, como *diabetes mellitus*, uso de antibióticos, uso de anticoncepcionais, gravidez, idade, uso de corticoides inalatórios, neutropenia; além de fatores externos como cirurgias, diálise e uso de cateteres (Mayer *et al.*, 2013; Pappas *et al.*, 2018). Os diferentes pH ao qual o fungo é exposto no organismo do hospedeiro fazem com que ele seja capaz de se adaptar tanto modulando o pH extracelular quando induzindo a transição morfológica, o mesmo tipo de adaptação ocorre com alterações nutricionais nos diferentes órgãos, o que é denominado plasticidade metabólica (Mayer *et al.*, 2013).

Durante a patogênese, são identificados três etapas no estabelecimento da doença: adesão, invasão e dano tecidual (Wächtler *et al.*, 2011). Na candidíase superficial, a resposta imune é desencadeada por ativação de linfócitos Th17, enquanto na infecção sistêmica, o fungo é capaz de disseminar-se pelo hospedeiro pela corrente sanguínea e no qual macrófagos e neutrófilos atuam fagocitando o microrganismo (**Figura 6**). Os fagócitos produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, peptídeos antimicrobianos, alterando as condições nutricionais e um dos mecanismos de adaptação do fungo é a mudança de obtenção de nutrientes passando da glicólise para a gliconeogênese (Mayer *et al.*, 2013).



**Figura 6: Mecanismo de infecção do fungo *C. albicans* e interação com o hospedeiro.** As leveduras são as células que participam da colonização do fungo no epitélio de mucosa, porém não desencadeiam um processo de resposta imunológica. Devido a alterações nas condições ambientais, as células modificam sua morfologia e formam hifas que iniciam o processo de invasão tecidual para a disseminação do fungo pelo organismo. Nesse momento a defesa imunológica do organismo reconhece os antígenos do patógeno, como a  $\beta$ -glucana, e inicia o processo de resposta com a ativação de linfócitos T helper do tipo Th17 (Cheng *et al.*, 2012).

#### 1.4 *Cryptococcus neoformans*

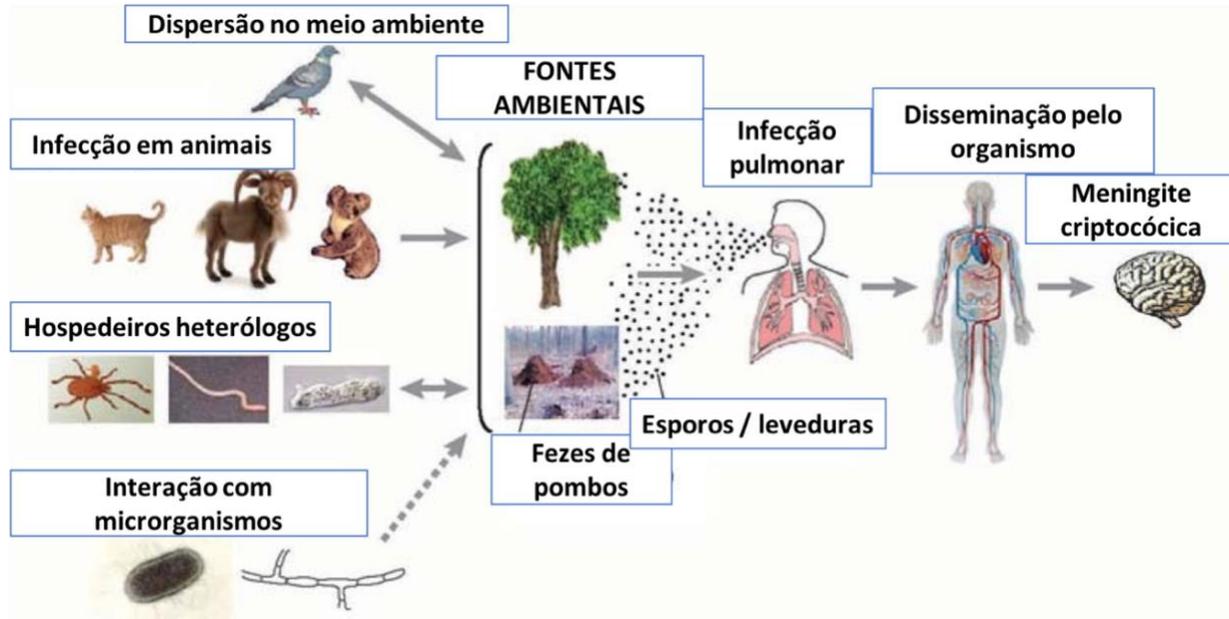
O gênero *Cryptococcus* foi descrito em 1833 por Kutzing e atualmente possui 70 espécies patogênicas e não patogênicas (Kwon-Chung *et al.*, 2012). A primeira infecção caracterizada como criptococose foi relatada no ano de 1894 a partir do isolado de cultura de uma lesão na tíbia de uma mulher de 31 anos na Alemanha. Inicialmente, o fungo pertenceu ao gênero do *Saccharomyces*, porém em 1901 é foi reclassificado como *Cryptococcus* (Kwon-Chung *et al.*, 2014). A identificação da doença e do gênero do fungo causador da criptococose resultou na descoberta de novas espécies e observação de variedades antigênicas no ano de 1950, identificando três sorotipos, A, B e C (Kwon-Chung *et al.*, 2014). Atualmente, relata-se a existência de cinco

sorotipos de *Cryptococcus* (A, B, C, D e AD), sendo o A correspondente ao *C. neoformans* var *grubii*; e D e AD ao *C. neoformans* var. *neoformans*; e, por fim, os sorotipos B e C são *C. gatti* (Idnurm *et al.*, 2005).

O fungo *C. neoformans* é um patógeno cuja morbi-mortalidade é motivo de preocupação, causando a criptococose que pode ser crônica e letal para animais e humanos (Casadevall e Pirofski, 2005). Na década de 1950, foi observado que o fungo era encontrado no solo e, principalmente, em fezes de pombo (Perfect & Casadevall, 2011). Nos anos 1960, o diagnóstico desse tipo de fungo tornou-se mais simples pela identificação da atividade da urease, presença de melanina e de cápsula (Kwon-Chung *et al.*, 2014). Estima-se em cerca de 1 milhão de infecções, resultando em cerca de 600 mil mortes por ano, sendo a maior parte dos casos na África Subsaariana, onde há uma alta incidência do vírus HIV comparado ao resto do mundo (Park *et al.*, 2009).

O fungo é encontrado no ambiente como um basidiomiceto liberando basidiósporos, uma das formas infecciosas, que podem ser inalados e então convertidos para forma leveduriforme à temperatura de 37°C no hospedeiro (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Pode ainda ser inalado já como levedura dissecada e no organismo, o patógeno pode causar infecções pulmonares ou disseminar até atingir o sistema nervoso central, provocando uma meningoencefalite (**Figura 7**). Após a inalação do fungo, este pode permanecer latente em granulomas por muitos anos no organismo e nunca desencadear a doença ou até mesmo ser eliminado (Srikanta *et al.*, 2014).

De acordo com as condições ambientais, o fungo sofre diferentes transições morfológicas, podendo ser visualizado atualmente nas formas shmoo, pseudo-hifas, hifas, leveduras e células titãs (**Figura 8**). As três primeiras formas são mais comuns de serem visualizadas em amostras ambientais ou condições laboratoriais manipuladas e raramente observadas no meio clínico, por estarem relacionadas ao ciclo sexual do fungo (Taylor-Smith e May, 2016). Pseudo-hifas são as formas intermediárias de uma levedura e uma hifa verdadeira e conferem resistência a fagocitose (Lin, 2009). Células leveduriformes são as observadas durante a infecção e, por fim, células titãs são células de levedura grandes e poliploides capazes de reduzir a fagocitose e resistir a situações de estresse celular, favorecendo a virulência do fungo (Taylor-Smith e May, 2016).



**Figura 7: Ciclo de vida e infecção do fungo *C. neoformans*.** O fungo é encontrado no meio ambiente no solo e principalmente em excreta de pombos e pode infectar animais como gatos, coelhos e bodes, além de interagir com insetos e amebas. No ser humano o fungo pode permanecer em uma forma latente, manifestar-se como uma infecção pulmonar, disseminar pelo organismo e por fim, atingir o sistema nervoso central, provocando uma meningocriptococose. Adaptado de (Lin e Heitman, 2006).

	LEVEDURA	CÉLULAS TITAN	SHMOO	PSEUDOHIFAS	HIFAS
MORFOLOGIA					
MACRÓFAGOS	Fagocitose Proliferação	Evita a fagocitose	?	Morte	Morte

**Figura 8: Morfologias encontradas em células de *C. neoformans*.** O fungo pode ser encontrado nas formas de levedura, células titãs, shmoo, pseudohifas e hifas, sofrendo as transições de uma forma para a outra devido a influência de fatores ambientais. No hospedeiro, ao entrar em contato com as células de defesa, cada tipo morfológico apresenta diferentes efeitos nas células de macrófagos responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo. Adaptado de Taylor-Smith e May (2016).

A adaptação do fungo *C. neoformans* tanto no hospedeiro quanto no meio ambiente ocorre por meio de modificações celulares através da indução de fenótipos que permitem a sobrevivência do patógeno e em alguns casos, fatores de virulência, como a capacidade de formação de cápsula polissacarídica, produção de melanina e habilidade de crescer a 37 °C (Alspaugh, 2015). Foi observado que isolados clínicos de pacientes são produtores de cápsula e mutantes incapazes em genes que afetam sua produção, apresentam virulência reduzida ou são avirulentos (Chang e Kwon-Chung, 1994; Hull e Heitman, 2002). Outras características estudadas que se relacionam a sobrevivência do patógeno e o estabelecimento da infecção são a parede celular, morfogênese, sobrevivência a diferentes tipos de estresse, e também, a produção de enzimas como a fosfolipase e a urease (Olszewski *et al.*, 2004; Djordjevic, 2010).

Um dos principais fatores de virulência do fungo e amplamente estudada é a cápsula polissacarídica, formada por manoproteínas, ácido hialurônico, ácido siálico e dois compostos de destaque, a glicuroxilomana (GXM) e galacto-glicuroxilomanano (GalGXM) (Kwon-Chung *et al.*, 2014). Sua formação, bem como seu tamanho variam de acordo com a resposta desencadeada pelo contato com o meio ambiente e seus estressores, modulando a expressão gênica, (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Alspaugh, 2015).

A capacidade de produzir melanina é outro fator associado a virulência do *C. neoformans*, que protege o fungo contra estresse ambiental e, no hospedeiro, apresenta uma capacidade imunomodulatória (Trofa *et al.*, 2011). Esse pigmento, depositado na parede celular, é sintetizado pela enzima lacase apenas na presença de alguns substratos e acredita-se que seja formado por compostos fenólicos e indólicos (Nosanchuk e Casadevall, 2003). A habilidade do fungo em crescer e proliferar a 37°C é determinante para que o este seja capaz de sobreviver no hospedeiro e estabelecer sua patogenicidade, uma característica que o *C. neoformans* possui e por isso, é capaz de provocar a criptococose (Kwon-Chung *et al.*, 2014).

Entre as enzimas que foram associadas a virulência de *C. neoformans*, a fosfolipase é um grupo que pode ser destacado, clivando fosfolipídios que originam em compostos importantes para o a sobrevivência do fungo (Alspaugh, 2015). Essa enzima demonstrou em *C. neoformans* ser importante durante a infecção do fungo no hospedeiro, favorecer a adesão do fungo nas células pulmonares do hospedeiro e permitir a sobrevivência no interior de macrófagos. (Cox *et al.*, 2001; Chayakulkeeree *et al.*, 2008). Outra enzima que está associada a virulência é a urease, que possui

destaque por ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, possivelmente, desempenhando um papel importante na invasão do sistema nervoso central (Olszewski *et al.*, 2004).

### **1.5 *Paracoccidioides lutzii***

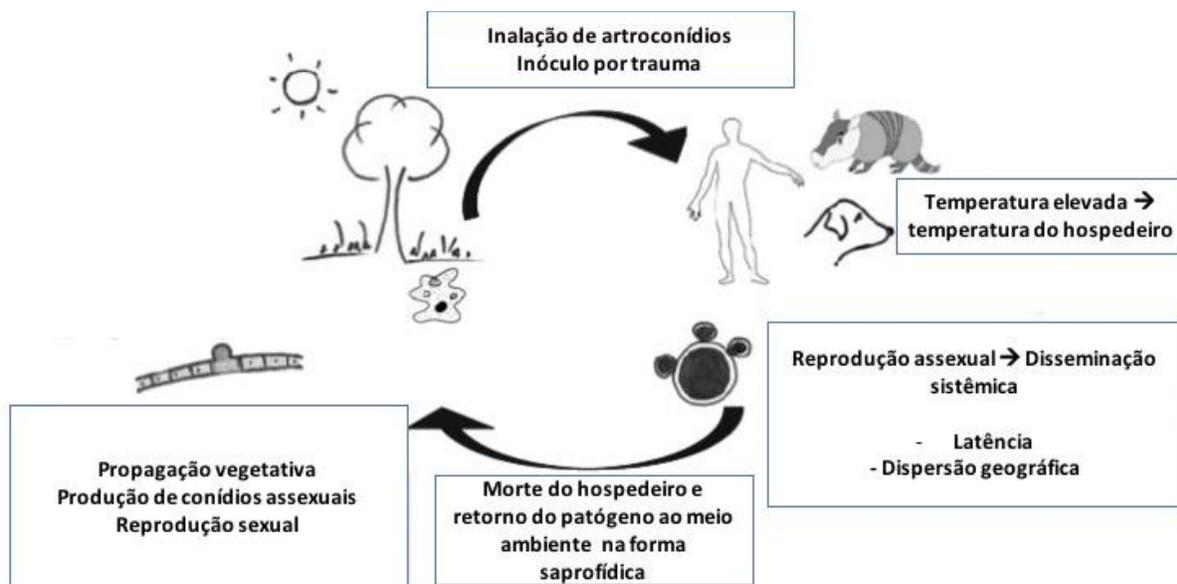
O gênero *Paracoccidioides* foi observado pela primeira vez em 1908 por Adolph Lutz, porém nomeado apenas em 1930 (Mendes *et al.*, 2017). Durante muitos anos acreditou-se que existia apenas a espécie *P. brasiliensis*, que atualmente é dividida em quatro grupos de acordo com estudos filogenéticos, S1, PS2, PS3 e PS4 (Goldani e Sugar, 1995; Matute *et al.*, 2006). Nas décadas de 2000, uma nova espécie, conhecida como Pb-01 *like* foi estudada até ser oficialmente descrita e proposta como a espécie *P. lutzii* (Teixeira *et al.*, 2009; Teixeira, M. E. M. *et al.*, 2014). Recentemente, novas três espécies foram propostas para o complexo *Paracoccidioides*, *P. américa* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3) e *P. venezuelensis* (PS4) (Turissini *et al.*, 2017). As espécies desse gênero são fungos termodimórficos endêmicos que pertencem ao filo Ascomycota encontrados por toda a América Latina, do México a Argentina e, na América do Sul principalmente no Brasil e na Colômbia. (Bagagli *et al.*, 2008).

Os fungos desse gênero são agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica que atinge principalmente trabalhadores rurais que estão diretamente em contato com o solo em áreas rurais ou de desmatamento, podendo inalar aerossóis contendo partículas fúngicas. Devido a esse perfil de pacientes, essas infecções no Brasil são mais encontradas nas regiões onde a agricultura é área de fronteira agrícola, como Centro-Oeste e Norte do País (Teixeira, M. M. *et al.*, 2014). Existem ainda, fatores como a moradia, nutrição, condições de trabalho e higiene que tornam esse tipo de indivíduo mais suscetível às infecções, além do uso de álcool e tabaco (Fortes *et al.*, 2011). Apesar desse perfil de pacientes, acredita-se que cerca de 50% da população das regiões endêmicas já tenham tido alguma exposição a esses patógenos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Existe uma predominância em homens sendo cerca de 10 a 15 homens infectados para cada mulher, devido a um efeito do estrógeno na inibição da transformação do fungo para levedura (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Bocca *et al.*, 2013).

A incidência da paracoccidioidomicose assim como outras micoses não apresentou alterações significativas com o aumento de pacientes imunocomprometidos, atingindo também pacientes com o sistema imunológico em equilíbrio, porém não se deve descartar a ocorrência dessa infecção no momento de diagnóstico de uma micose em pacientes com HIV em regiões

endêmicas. Existem poucos relatos de infecções por *Paracoccidioides* nesse grupo de pacientes, mas acredita-se que os dados são subestimados e que a ocorrência seja baixa devido ao uso de trimetropim-sulfametoxazol realizado na profilaxia de pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*, que também é um fármaco muito eficaz contra *P. brasiliensis* (Goldani e Sugar, 1995).

Este patógeno apresenta-se como levedura a 37°C no hospedeiro e à temperatura ambiente (22 à 25°C) na forma de micélio. O fungo é encontrado na forma saprofítica no meio ambiente em locais úmidos já devastados, porém tem sido encontrado frequentemente associado às espécies de tatu *Dasyurus novemcintus* e *Cabassous centralis* (Teixeira, M. M. *et al.*, 2014). Geralmente, o fungo é encontrado como micélio no solo, liberando artroconídios que podem dispersar-se e ambas as estruturas podem ser inaladas atingindo os bronquíolos onde a expressão de genes se altera ocorrendo transformações estruturais e funcionais, aumentando a produção de  $\alpha$ -1,3-glucana na parede celular, que passa a ser o principal polissacarídeo da parede para que ocorra a transição morfológica do fungo para leveduras, que é a forma patogênica do fungo, o que pode ser observado na **Figura 9** (San-Blas *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2017).



**Figura 9: Ciclo de vida dos fungos do gênero *Paracoccidioides*.** Os fungos desse gênero são encontrados a temperatura ambiente na forma de micélio em locais úmidos, árvores e tocas de tatu, infectando principalmente trabalhadores rurais por terem mais contato com o solo. Os artroconídios liberados podem ser inalados e atingir os bronquíolos onde irá ocorrer uma transição morfológica para leveduras, apresentando-se em sua forma patogênica, que pode permanecer em latência por muitos anos, provocar infecção aguda e ainda disseminar para o organismo (Bagagli *et al.*, 2008).

A doença é dividida em forma aguda ou subaguda, conhecida como tipo juvenil, que atinge 3 a 5% das infecções causadas pelo fungo, sendo observada principalmente em crianças e adolescentes e, atingindo, normalmente, pacientes de ambos os sexos (Franco *et al.*, 1987; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Essa forma pode ser moderada ou severa e quando não é tratada pode provocar a rápida disseminação do fungo atingindo os pulmões, gânglios, baço, fígado e outros órgãos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). A forma crônica, que ocorre em 90% dos casos, afeta adultos e provoca lesões unifocais, quando apenas um órgão é afetado, ou multifocais, quando envolve mais de um órgão, normalmente pulmões e mucosa oral; e, por fim, a forma sequelar pode se manifestar como uma doença pulmonar crônica obstrutiva ou mesmo fibrose nos órgãos infectados decorrente do processo de formação de granulomas, (Franco *et al.*, 1987; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Em pacientes com HIV, a doença manifesta-se de forma disseminada provocando febre, perda de peso, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, erupções cutâneas e pode chegar a provocar sintomas neurológicos (Goldani e Sugar, 1995).

A interação patógeno-hospedeiro durante a infecção resulta na síntese de citocinas que ativam linfócitos T, podendo ainda ocorrer a participação de neutrófilos na defesa inicial, porém o resultado é a formação de granulomas com predomínio de células T CD4+ (Goldani e Sugar, 1995; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). O tratamento do paciente envolve melhoria da resposta imunológica do organismo contra o patógeno e o uso de antifúngicos, o que resulta no controle da replicação do fungo, porém podem não eliminar todos os microrganismos, que permanecem em granulomas de forma latente por muitos anos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). A resposta do hospedeiro frente a infecção depende ainda de outros fatores como sexo, idade, estado nutricional, quantidade de fungo inalado e até mesmo fatores genéticos individuais de cada paciente (Mendes *et al.*, 2017).

### **1.6 Fármacos antifúngicos utilizados na clínica**

O primeiro avanço no tratamento de infecções fúngicas ocorreu com o desenvolvimento de polienos e a utilização da anfotericina B por infusão em infecções graves na década de 1950. O fármaco, embora apresentasse um bom efeito antifúngico, causava efeitos adversos graves nos pacientes, como a nefrotoxicidade (Maertens, 2004). A busca por novos alvos levou ao surgimento de novos fármacos com outros alvos terapêuticos ao longo do final do século XX, como flucitosina

(Denning e Bromley, 2015; Nett e Andes, 2016). No entanto, ainda hoje existe um número limitado de classes de fármacos antifúngicos disponíveis para utilização clínica no tratamento de infecções e sua escolha clínica depende de fatores como o patógeno, o tipo e gravidade da infecção e a susceptibilidade do fungo à fármacos. Atualmente, a terapêutica clínica para o tratamento de micoses sistêmicas é baseada nas classes: polienos, representados principalmente pela anfotericina B; fluoropiridinas, como a flucitosina; azóis, entre os quais os principais são cetoconazol, fluconazol e itraconazol; equinocandinas que são rerepresentadas pela caspofungina, anidulafungina e micafungina; e alilaminas, representada pela terbinafina (Sable *et al.*, 2008). As principais características dessas classes podem ser visualizadas na **Tabela 1**.

A membrana plasmática é o alvo de muitos fármacos antifúngicos disponíveis, sendo o ergosterol seu principal composto de atuação, lipídeo importante para manter a estabilidade estrutural. A ausência de ergosterol na célula fúngica prejudica a homeostase celular (Kathiravan *et al.*, 2012). Os azóis atuam impedindo a síntese do ergosterol pela inibição da enzima do citocromo P450 Erg11, lanosterol-14- $\alpha$ -demetilase, o que provoca alterações na permeabilidade da membrana e na atividade de proteínas de membrana, além do acúmulo de esteróis tóxicos (Shapiro *et al.*, 2011). A via do ergosterol é explorada também pelas alilaminas, terbinafina e nafitina, que são eficazes contra dermatófitos. Essa classe de fármacos liga-se a escaleno epoxidase, provocando o acúmulo de escaleno antes mesmo da produção do lanosterol no início da via, acumulando esteróis tóxicos causando um efeito fungistático da fármacos (Scorzoni *et al.*, 2017). Os polienos são fármacos capazes de formar poros que permitem a passagem de íons provocando um efluxo de potássio e consequente desequilíbrio osmótico, que resulta na morte celular (Nett e Andes, 2016). Apresentam alta toxicidade pela semelhança com o colesterol de mamíferos, porém formulações mais novas de complexos lipídicos são capazes de reduzir essa característica tendo como desvantagem alteração na capacidade antifúngica (Shapiro *et al.*, 2011).

**Tabela 1: Principal Classificação dos antifúngicos utilizados para o tratamento de micoses.**

CLASSIFICAÇÃO	ALVO	MECANISMO DE AÇÃO	FÁRMACOS
Polienos (Nett e Andes, 2016)	Membrana celular	Formação de poros na membrana	Nistatina, anfotericina B
Azóis (Puia-Dumitrescu e Smith, 2017)	Membrana celular	Ligação a lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase	Fluconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol, ravuconazol
Alilaminas (Kathiravan <i>et al.</i> , 2012)	Membrana celular	Ligação a escaleno epoxidase	Terbinafina, naftifina
Equinocandinas (Puia-Dumitrescu e Smith, 2017)	Parede celular	Inibição do complexo da $\beta$ -1,3-glucana sintase	Caspofungina, micafungina, anidulafungina
Análogos de pirimidina (Cowen <i>et al.</i> , 2014)	Ácidos nucleicos	Inibe o metabolismo de pirimidina	Flucitosina

Elaborada pela autora

As equinocandinas são fármacos derivados sintéticos de lipopeptídeos produzidos por várias espécies de fungos que atuam nas paredes celulares dos fungos (Vandeputte *et al.*, 2012). Essa é a classe mais nova de antifúngicos e atua na parede celular inibindo a 1,3- $\beta$ -glucana sintase, o principal complexo de síntese dessa estrutura, bloqueando a função da enzima e afetando a integridade da parede celular (Maubon *et al.*, 2014). A síntese de uma parede celular defeituosa provoca a ruptura das leveduras e crescimento aberrante de hifas (Kanafani e Perfect, 2008). Possui três fármacos nessa classe, anidulafungina, caspofungina e micafungina, com atividades antifúngicas semelhantes, diferindo mais nas propriedades farmacocinéticas. No geral, é uma classe com bastante segurança terapêutica, apresentando menos efeitos adversos e interações medicamentosas, menor incidência de resistência, pelo menos por enquanto, além de possuir amplo espectro de ação e alta eficácia. Sua principal desvantagem é o alto custo e sua

administração ser endovenosa, já que ela não é compatível para administração oral (Chang *et al.*, 2017).

Existem fármacos que atuam na síntese de DNA e proteínas como as fluoropiridinas, a 5-flucitosina e a 5-fluoracil, que são análogos sintéticos estruturais da citosina de DNA, são convertidos em um composto que é incorporado ao RNA provocando o término prematuro da síntese de DNA. As sordarinas atuam inibindo a síntese de proteínas do fungo bloqueando a tradução e conseqüentemente afetando crescimento celular (Kathiravan *et al.*, 2012). Por fim, os microtubulos das células são alvos de fármacos como a griseofulvina que é capaz de desestruturar a célula provocando uma desordem e afetando o processo de mitose do fungo (Scorzoni *et al.*, 2017).

O tratamento das micoses abordadas nesse trabalho, criptococose, candidíase invasiva e paracoccidioidomicose são baseados nas classes dos azóis, equinocandinas, polienos e análogos de pirimidina (**Tabela 2**). No caso da paracoccidioidomicose, podem ser utilizados diversos esquemas terapêuticos e sua escolha deve ser baseada na severidade da doença bem como nas condições individuais de cada paciente, além dos diferentes genótipos (Bocca *et al.*, 2013). Itraconazol é a melhor escolha para formas clínicas leves a moderadas, porém a combinação de sulfametoxazol-trimetoprima também é uma boa opção, e por fim pode se usar nesse caso voriconazol. Em casos severos que há internação dos pacientes, o fármaco de escolha é a anfotericina B, no entanto quando atinge o sistema nervoso central, o paciente deve ser tratado com fluconazol (Marques, 2012).

**Tabela 2: Modelo de um dos esquemas terapêuticos padronizados para as infecções fúngicas.**

FUNGO	DROGA	DOSE	DURAÇÃO
<i>C. neoformans</i> (King <i>et al.</i> , 2018)	Fluconazol	400 mg/kg/dia	10 semanas
	Flucitosina	100 mg/kg/dia dividida em 4 doses	2 semanas
	Anfotericina B	Desoxicolato 0,7-1 mg/kg/dia	6-10 semanas
<i>C. albicans</i> (Pappas <i>et al.</i> , 2016)	Caspofungina	50 mg/dia	Terapia inicial
	Micafungina	100 mg/dia	5 dias
	Anidulafungina	100 mg/dia	
	Fluconazol	400-800 mg/dia	Inicial e manutenção
	Voriconazol	200-400mg 2x ao dia	Até semanas após eliminação do patógeno no sangue.
	Anfotericina B	Formulações lipídicas 3-5 mg/kg/dia	5 dias
		Itraconazol	200 mg/dia
<i>Paracoccidioides sp.</i> (Shikanai-Yasuda <i>et al.</i> , 2017)	Cotrimoxazol	Trimetoprim 160 mg + Sulfametoxazol 800 mg	18-24 meses
	Anfotericina B	Desoxicolato 0,5-0,7 mg/kg/dia	2-4 semanas
		Formulações lipídicas 3-5 mg/kg/dia	

**Elaborado pela autora**

Em pacientes com infecção sistêmica por *Candida sp.* a escolha é utilizar equinocandinas, sendo a caspofungina e a anidulafungina aprovadas pelo *Food and Drug Administration's* (FDA) para o tratamento eficaz e com baixa toxicidade (Pfaller e Diekema, 2007). Como alternativa em pacientes não muito graves pode-se utilizar fluconazol, que é eficaz contra a maioria das espécies e primeira escolha no caso de profilaxia, de candidíase mucocutânea e no tratamento empírico da infecção (Maertens, 2004; Ruhnke, 2014). A anfotericina B também pode ser utilizada em infecções por *Candida sp.*, porém existe uma preocupação de seu uso devido a nefrotoxicidade (Ruhnke, 2014). Infecções causadas por esses fungos no trato urinário são tratadas com fluconazol, já que é um fármaco excretado de forma inalterada na urina (Sionov *et al.*, 2013).

Em criptococcose foi consolidado como padrão ouro a combinação de anfotericina B com flucitosina, esquema que demonstrou grande efetividade contra a infecção (Pappas, 2011). A estratégia terapêutica atualmente pode ainda variar de acordo com grupos de risco, o tipo de imunossupressão, grávidas, crianças, sintomas e ainda, com a condição financeira do paciente (Perfect *et al.*, 2010). O fluconazol no caso de infecções por *Cryptococcus* sp. tem sido utilizado também como terapia primária na infecção pulmonar e na consolidação da meningite criptococócica, já que apresenta como vantagem ultrapassar a barreira hematoencefálica (Chang *et al.*, 2017), o que é um grande desafio no tratamento. Portanto, uma busca relevante é encontrar opções de tratamento principalmente voltados à infecção no sistema nervoso central (SNC). Inibidores da calcineurina, como tacrolimus e ciclosporina, demonstraram afetar o crescimento celular provocando uma redução da infecção no SNC, podendo ser utilizados como adjuvantes da terapia (Pappas, 2011).

Um novo fármaco aprovado pelo FDA em 2015 para o tratamento de aspergilose invasiva e micoses de mucosa, isavuconazol, já está disponível para uso nos Estados Unidos e na Europa. Esse antifúngico, classificado como um triazol, demonstrou amplo espectro, com suscetibilidade *in vitro* contra espécies de *Candida* sp., *C. neoformans*, *C. gattii*, *Aspergillus* sp., fungos dimórficos e de outras classes (Pettit e Carver, 2015; Seyedmousavi *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2017).

### **1.7 Limitações dos fármacos antifúngicos atuais**

Muitas mortes por micoses que ocorrem por ano poderiam ser evitadas por um diagnóstico bem feito acompanhado de um tratamento eficaz, porém a utilização da terapia preconizada para cada infecção é limitada pelo acesso à esses compostos, seus efeitos adversos e casos de resistências aos patógenos (Perfect e Bicanic, 2015). Um problema que merece destaque é a toxicidade dos fármacos e a falta de disponibilidade a grande parte de pacientes infectados uma vez que requer cuidados na administração e que existe um grande número de pacientes em condições precárias. Na África Sub-Saariana o uso do fluconazol frequente está relacionado a uma taxa de mortalidade >60% em dez semanas (Denning e Bromley, 2015).

O tratamento com antifúngicos muitas vezes torna-se limitado devido ao pequeno número de alvos moleculares disponíveis, baixo espectro de ação, à resistência dos patógenos, presença de biofilmes na infecção, a farmacocinética dos fármacos e seus respectivos efeitos adversos graves

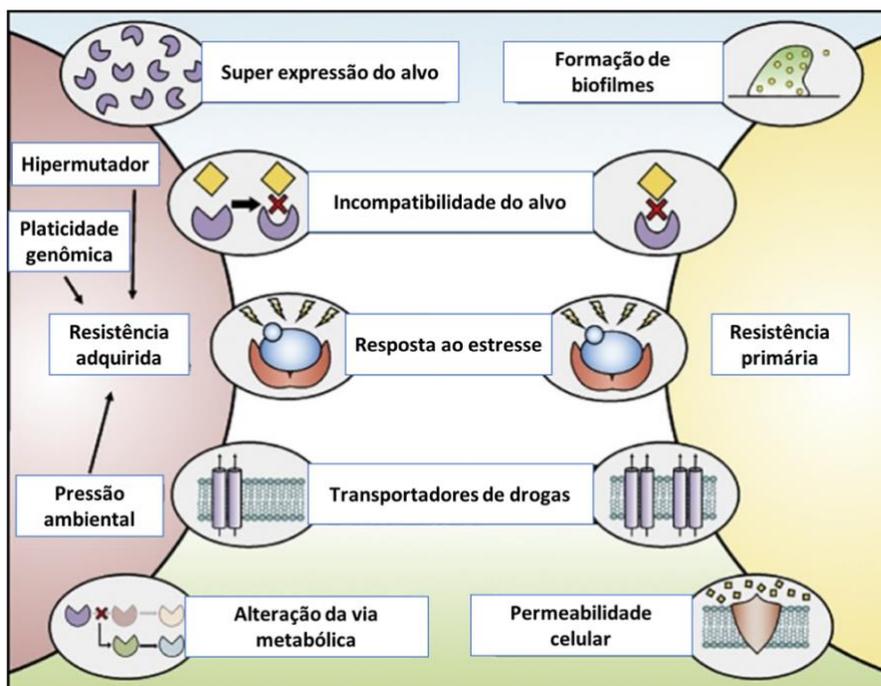
que podem resultar no agravamento da infecção e na não adesão do paciente (Sable *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2017). Além disso, o tratamento muitas vezes é longo, chegando a dois anos no caso da paracoccidiodomicose, o que afeta a adesão do paciente durante todo o tempo, levando ao abandono da terapia antes do término. A posologia do medicamento envolvendo o número de doses tomadas diariamente também resulta em desistências no período em que o uso do medicamento é essencial resultando em recidivas da doença. Nesse contexto, o desenvolvimento de novos antifúngicos mais eficazes, com respostas mais rápidas ou mais específicas poderia ser uma solução para a problemática atual dos fármacos comercialmente disponíveis e assim, poderia por exemplo, modular o sistema imunológico do hospedeiro, possibilitando uma redução mais rápida da inflamação granulomatosa na paracoccidiodomicose.

A resistência aos fármacos resulta na falha terapêutica e pode estar associada a características intrínsecas dos microrganismos ou a uma capacidade de tornarem-se resistentes após a exposição a esses compostos através de alterações na expressão gênica. A resistência primária que ocorre no caso de *Cryptococcus* com equinocandinas (Revie *et al.*, 2018). Em laboratório a resistência é observada pelo aumento da concentração mínima inibitória do fármaco preconizado para determinado patógeno (Sanguinetti *et al.*, 2015). Em 2009, foi identificada uma nova espécie de *Candida*, *C. auris*, um patógeno emergente associado a infecções invasivas em locais de assistência à saúde, com resistência ao fluconazol e já possuindo cepas com relatos de multirresistência às três principais classes de antifúngicos, azóis, polienos e equinocandinas (Bidaud *et al.*, 2018). Observa-se que as espécies apresentam variações entre si quanto ao perfil de resistência, que também podem ser observadas em diferentes isolados de uma mesma espécie, estágios de crescimento e até mesmo em diferentes tipos morfológicos (Revie *et al.*, 2018). Os biofilmes são estruturas capazes de conferir resistências a azóis e equinocandinas pelo efluxo de fármacos e seus transportes para dentro da matriz (Cowen *et al.*, 2014).

A anfotericina B deoxicolato e a flucitosina são fármacos relacionadas a efeitos adversos graves, como a nefrotoxicidade e toxicidade na medula óssea, respectivamente, portanto devem ter sua administração monitorada. Além disso, ambos os compostos são onerosos e poucos distribuídos pelo mundo, dificultando o seu uso em muitos pacientes. A preparação da anfotericina lipossomal, apresenta menos efeitos adversos, porém, o custo é ainda maior e é utilizada mais restritamente em pacientes transplantados em regiões com recursos financeiros. A flucitosina apresenta ainda como desvantagem seu esquema terapêutico de quatro vezes ao dia, resultando em

baixa adesão do paciente ao tratamento. Portanto, o fluconazol têm sido o fármaco mais amplamente utilizado, sendo fornecido por várias empresas farmacêuticas em todo o mundo a um custo baixo além de ser um fármaco de fácil administração (Perfect e Bicanic, 2015).

A via do ergosterol participa do mecanismo de ação de vários antifúngicos e pode sofrer mutações que favorecem a resistência em genes como ERG6 e ERG3 (Jensen-Pergakes *et al.*, 1998; Sanglard e Odds, 2002). Os fármacos azólicos por serem de primeira escolha para muitas infecções, entram em contato com um maior número de patógenos e provocam mais resistência. Esses antifúngicos atuam se ligando a enzima Erg11, provocando o acúmulo de precursores da via de síntese do ergosterol (Cowen *et al.*, 2014). Mecanismos de resistência a essa classe de fármacos envolvem a substituição de aminoácidos e mutações nessas proteínas impedindo a ligação dos fármacos, superexpressão da Erg11, produção de mRNA estáveis, além da ativação de bombas de efluxo que transportam as fármacos para fora da célula, como pode ser observado na **Figura 10** (Scorzoni *et al.*, 2017).



**Figura 10: Mecanismos de resistência dos fungos contra os azóis.** Os patógenos são capazes de desenvolver diferentes mecanismos para sobreviver a ação dos azóis, sendo alguns deles intrínsecos para determinadas cepas ou característicos de espécies e, outros, desenvolvidos após a exposição. Esses mecanismos envolvem mutações genéticas, superexpressão ou alterações do alvo da molécula, alteração da via metabólica, formação de biofilmes, alteração de transportadores de fármacos com a ativação de bombas de efluxo. (Revie *et al.*, 2018).

As equinocandinas são fármacos novos, porém já foram descritos mecanismos de resistência essa classe de antifúngicos após a ocorrência de falhas no tratamento clínico. Entre esses mecanismos destaca-se a ativação de vias relacionadas ao estresse celular desencadeado pela desestabilização da parede pela atuação da fármacos, provocando um aumento na produção de quitina, alterações na composição da membrana plasmática, alterações de expressão gênica (Cowen *et al.*, 2014).

O tratamento com falha terapêutica resulta em alta morbi-mortalidade associada a infecções fúngicas, além do alto custo em internações hospitalares e outras despesas médicas (Sanguinetti *et al.*, 2015). Infecções como a candidemia podem ainda ser evitadas por medidas profiláticas, como o controle do uso de antimicrobianos, melhoria da higiene nos hospitais, como a das mãos e de instrumentos como o cateter, e inclusive utilização de antifúngicos em profilaxia de pacientes internados mais suscetíveis em determinados setores de hospitais (Pfaller e Diekema, 2007). No entanto, a ocorrência de infecções fúngicas requer o desenvolvimento de novas estratégias de fármacos antifúngicos que sejam capazes de mitigar a infecção no hospedeiro de forma eficaz sem causar prejuízos ao organismo devido as condições imunológicas dos pacientes infectados, que em muitos casos apresentam alguma imunodeficiência no organismo (Cowen *et al.*, 2014).

A resistência de fungos a fármacos, embora seja relatada a apenas algumas espécies, é responsável por falhas de tratamento e agravamento das infecções, como a *C. glabrata* que já apresentou cepas resistentes a fluconazol, voriconazol e equinocandinas. Algumas espécies possuem resistência intrínseca a determinados antifúngicos, como *C. krusei* ao fluconazol, *Aspergillus terreus* a anfotericina B, *Cryptococcus* spp. a equinocandinas (Denning e Bromley, 2015). Uma alternativa no tratamento de espécies resistentes é a utilização de compostos com propriedades farmacológicas distintas capazes de reverter a resistência do patógeno, entre eles, o verapamil, os derivados da milbemicina, os alcalóides lipofílicos, os terpenóides e os flavonoides, que afetam o mecanismo que resulta em tal fenótipo e torna o patógeno suscetível ao antifúngico (Shahid, 2016).

Terapias combinadas ou variando os agentes antifúngicos apresentam como uma alternativa para reduzir a resistência fúngica, além da utilização de forma racional das novos compostos, porém as abordagens terapêuticas deve ser bem avaliadas quanto ao benefício para o paciente, pois podem gerar ou agravar os efeitos adversos do medicamento (Chang *et al.*, 2017).

Estudos com fluconazol revelaram que sua utilização combinada com fármacos de diferentes propriedades terapêuticas, tais como, antiparasitários, fármacos cardiovasculares, dermatológicas, moduladores hormonais, antibióticos e até fármacos neurolépticos que foram capazes de melhorar a atividade antifúngica do azol contra cepas resistentes, *C. neoformans*, *C. gatti* e *C. albicans* (Spitzer *et al.*, 2011; Zhai *et al.*, 2012).

### **1.8 Busca por novas estratégias terapêuticas**

Existem várias etapas no desenvolvimento de um fármaco até se tornar um bom antifúngico para um paciente e chegar ao uso clínico, pois eles devem ser eficazes na erradicação do patógeno, apresentar propriedades farmacológicas no hospedeiro que permitam que ele tenha ação no organismo, passando pelos mecanismos de distribuição, metabolismo, absorção e eliminação, além de apresentarem perfil de segurança e toxicidade caracterizados. Esta é parte dos problemas dos fármacos atuais, já que anfotericina B e equinocandinas são administradas de forma endovenosa, alguns compostos provocam efeitos adversos graves e interagem com enzimas hepáticas no organismo (Nett e Andes, 2016). Um aspecto que dificulta a chegada de novas fármacos ao mercado é o investimento financeiro e o longo período de desenvolvimento para um novo composto chegar ao mercado, o que pode levar cerca de 8 a 10 anos (Scorzoni *et al.*, 2017).

A aprovação de uso clínico de um fármaco requer várias etapas experimentais desde a seleção do alvo, identificação do mecanismo de ação, testes de toxicidade, interações medicamentosas, testes farmacocinéticos e farmacodinâmicos (Campoy e Adrio, 2017). Algumas empresas, ao longo dos últimos anos, trabalharam com o objetivo de otimizar o processo de produção dos antifúngicos disponíveis a fim de melhorar o rendimento diminuindo os gastos e aumentando a quantidade e qualidade do produto oferecido (Shahid, 2016). O desenvolvimento de antifúngicos não demonstrou ser lucrativo para empresas farmacêuticas e com o objetivo de incentivar a pesquisa por novas moléculas contra infecções fúngicas, a agência americana FDA (Food and Drug Administration's) garantiu cinco anos a mais de exclusividade na manufatura àquelas empresas que desenvolvessem compostos relacionados às espécies *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus* (Denning e Bromley, 2015) No entanto, mesmo com esse benefício o último antifúngico aprovado no mercado foi a anidulafungina em 2006 (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Denning e Bromley, 2015; Fuentefria *et al.*, 2018).

Pesquisadores buscam, ainda, elucidar a biologia e metabolismo dos microrganismos tanto *in vitro* como *in vivo*, bem como a interação patógeno-hospedeiro (Vandeputte *et al.*, 2012). Resultados de estudos que buscam compreender os mecanismos envolvidos na patogênese bem como a bioquímica dos patógenos contribuem para a identificação de um alvo eficaz, já que um dos desafios na busca de mecanismos de ação é o fato dos fungos serem eucarióticos e possuírem muitas proteínas comuns aos próprios hospedeiros, gerando risco de toxicidade (Denning e Bromley, 2015). No entanto, o estudo de compostos com propriedades antifúngicas revelou-se promissor, nos últimos anos, com novos fármacos sendo analisados em fases clínicas. A nicomicina Z foi um exemplo de fármaco atuando na parede celular que chegou a estudos de fase II demonstrando efeitos contra coccidioidomicoses e infecções por *Aspergillus sp.* Um potencial antifúngico que está nessa fase clínica é um peptídeo de membrana catiônico de terceira geração com ação rápida e eficaz denominado Novexatin (C42H84N28O7, NP213) da *Novabiotics (Abberdeen, Reino Unido)* (Shahid, 2016).

Existem alternativas para facilitar e minimizar o tempo de descoberta de alvos terapêuticos, como a genômica comparativa, a produção de anticorpos, a busca de propriedades terapêuticas em derivados fúngicos, fármacos de diferentes propriedades farmacológicas e testes de diferentes associações farmacológicas, que têm sido estudados por pesquisadores de todo o mundo (Abadio *et al.*, 2011). As vias já exploradas pelos antifúngicos clássicos são alvos de síntese de novos compostos mais modernos que tenham mais eficácia e menos efeitos adversos, como a via do ergosterol, explorando o próprio Erg11 que é alvo dos azóis ou ainda outras enzimas como a Erg6 e Erg2. Moléculas que atuam em vias que não foram anteriormente exploradas estão sendo estudadas, como biossíntese de esfingolípídeos, proteínas de ancoragem, biossíntese de aminoácidos, via da pirimidina, ciclo glioxilato, vias de sinalização e fatores traducionais. Uma abordagem que tem sido utilizada é a busca por propriedades antifúngicas em fármacos já utilizados comercialmente, porém com outras finalidades clínicas, dessa forma, observou-se que fármacos antiparasitários como cloroquina e quinacrina são efetivos em algumas infecções fúngicas. Este mesmo efeito foi observado com um medicamento utilizado para artrite reumatoide, auranofina; medicamentos antiinflamatórios não esteroidais, aspirina e ibuprofeno, e o antidepressivo sertralina (Nicola *et al.*, 2018). O uso de nanopartículas e modificações moleculares e estruturais nos atuais antifúngicos também podem resultar em fármacos menos

tóxicos, aumentar a biodisponibilidade, melhorar o espectro antifúngico e evitar os mecanismos de resistência (Scorzoni *et al.*, 2017).

Azóis mais modernos como voriconazol e posaconazol possuem estruturas semelhantes a um azol mais antigo como o fluconazol e itraconazol, porém apresentam perfis farmacocinéticos melhores para o tratamento de infecções (Scorzoni *et al.*, 2017). A *Pulmatrix Inc.* (Massachusetts, Estados Unidos) desenvolveu uma nova tecnologia de pequenas partículas compactas e dispersíveis que são inaladas para a administração intrapulmonar criando um composto com itraconazol denominado PUR1900 eficaz apresentando poucos efeitos adversos utilizando a tecnologia iSPERSE (Shahid, 2016).

Análise de genomas, transcriptomas e proteomas são ferramentas tecnológicas capazes de fornecer informações úteis do processo de interação patógeno-hospedeiro durante a infecção além de permitir um desenho racional de moléculas que possam atuar como antifúngico. O conhecimento da expressão e regulação gênica assim como de proteínas de diferentes condições a que o fungo é exposto no hospedeiro facilita a compreensão dos mecanismos moleculares que participam durante a resposta imunológica do hospedeiro e habilidade do fungo em sobreviver ao ataque de células de defesa (Chin *et al.*, 2016). Identificar genes essenciais ou importantes para viabilidade celular de fungos é uma estratégia alternativa para a busca de novos alvos para fármacos antifúngicos. Em *C. albicans*, por exemplo, muitas vias metabólicas têm sido estudadas para a identificação de novos alvos moleculares e foram demonstrados a essencialidade de genes desse fungo (Roemer *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2015). Em *P. brasiliensis* foram realizadas análises de sequências do genoma que revelaram novos alvos moleculares (Felipe *et al.*, 2005).

Por análise de genômica comparativa foram identificados 10 genes conservados em fungos patogênicos e a maioria deles ausentes no genoma humano, com diferentes localizações celulares que poderiam codificar proteínas alvos para a terapia antifúngica: *trr1*, *aur1*, *mak5*, *chs1*, *tom40*, *kre6*, *fks1*, *kre2*, *erg6*, *rim8* (**Tabela 3**). Baseado em alguns critérios dos quais poderiam ser vantajosos para o desenvolvimento de fármacos antifúngicos entre eles, ser uma enzima; ser essencial ou importante para a sobrevivência do fungo no interior do hospedeiro; ter uma localização celular acessível para que os fármacos tenham sua atividade facilitada e não ser auxotrófico; foram selecionados pelo grupo de pesquisa no qual o projeto se insere, quatro potenciais genes alvo para serem estudados: *kre2*, *erg6*, *rim8* e *trr1* (Abadio *et al.*, 2011). Muitos estudos têm sido realizados nos últimos anos a fim de encontrar novos tratamentos antifúngicos.

A genômica comparativa é apenas uma das estratégias para se iniciar a busca de novos compostos para o tratamento dessas micoses, porém existem muitas outras estratégias para tal fim (Pappas, 2011).

**Tabela 3: Alvos moleculares identificados por genômica comparativa potenciais para fármacos antifúngicos.**

<b>Gene</b>	<b>Processo Biológico</b>	<b>Citocalização</b>
<i>aur1</i>	Metabolismo celular	Golgi e membrana
<i>mak5</i>	Biogênese ribossomal	Nucléolo
<i>chs1</i>	Biogênese/degradação da parede celular	Membrana
<i>tom40</i>	Transporte de proteínas	Membrana mitocondrial
<i>kre6</i>	Biogênese/degradação da parede celular	Membrana do aparato de Golgi
<i>fks1</i>	Biogênese/organização da parede celular	Membrana
<i>trr1</i>	Homeostase do redox celular	Citoplasma
<i>rim8</i>	Regulador da resposta ao pH	Citoplasma
<i>kre2</i>	Manosilação de proteínas	Membrana do complexo de Golgi
<i>erg6</i>	Biossíntese do ergosterol	Membrana do retículo endoplasmático

Adaptado de Abadio, 2011

O composto VT-1161 é um tetrazol, atuando na membrana plasmática, que foi desenvolvido pela empresa *Viamet Pharmaceuticals* e este sendo estudado nos últimos anos. Resultados preliminares promissores foram obtidos em testes de candidíase vaginal (Chang *et al.*, 2017). Testes realizados com cepas de *C. albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol demonstraram concentrações inibitórias baixas para ambos os tipos (Garvey *et al.*, 2015). Além disso, a segurança e eficácia já foram demonstradas em um estudo de fase II realizado em mulheres

com infecções de repetição que utilizaram o composto ou placebo resultando na ausência de evidência de efeitos adversos relevantes (Brand *et al.*, 2018). Outro composto, o pramiconazol está sendo investigado e já demonstrou eficácia via oral e tópica comparáveis aos fármacos de referência contra *C. albicans* e *Microsporium canis* (De Wit *et al.*, 2010).

Componentes variados da organização celular e manutenção homeostática do fungo podem ser potenciais alvos para fármacos, como enzimas citoplasmáticas, vias de sinalização, vias síntese e degradação proteica, síntese de ácidos graxos, formação de microtúbulos, ativação da proteína quinase cAMP, que já tem um inibidor patenteado pela *Pfizer Ltda (Tadworth, Inglaterra)*, o p38 MAPK. Outros alvos ainda que podem influenciar a virulência e o crescimento dos fungos são o transporte vesicular, síntese de GMP, membrana da mitocôndria, síntese de nucleotídeos e de esfingolipídeos (Del Poeta, 2016; Shahid, 2016). A parede celular é constituída por estruturas que mantêm sua estabilidade e sua função, dessa forma qualquer fator que altere a biossíntese dessa estrutura pode resultar em seu enfraquecimento e um estresse para o microrganismo. Baseado nessa ideia, foi identificado que a glucosamina-6-fosfato, a  $\beta$ -1,6 glucana sintase, glicosilfosfatidilinositol (GPI), o ácido N3- (4-metoxifu maroil) 2, 3 diaminopropanóico e seus derivados podem ser alvos promissores (Kitamura, 2010; Shahid, 2016).

O SCY-078 ou MK-3118 possui como alvo a parede celular e está em fase de teste. As equinocandinas embora sejam bons alvos terapêuticos, possuem a limitação de serem endovenosas e, portanto, um fármaco oral atuando nesse alvo poderia ser um grande avanço na terapia antifúngica. Esse composto apresenta-se como um bom candidato, já que é um inibidor da glucana sintase com alterações químicas na estrutura que permite a administração oral e está com estudos de fase II (Chang *et al.*, 2017). Testes de concentração inibitória mínima dos fármacos foram realizados em diferentes espécies de *Candida* sp. e *Aspergillus* sp. apresentando-se eficaz na maioria das cepas testadas, incluindo àquelas já resistentes às equinocandinas atuais (Jiménez-Ortigosa *et al.*, 2014). Por fim, os testes *in vivo*, embora requeiram mais estudos, mostraram resultados farmacológicos promissores em um primeiro momento para a utilização dos fármacos na forma oral (Lepak *et al.*, 2015). Outro composto que atua na parede celular investigado é a aminocandina que demonstrou índice terapêutico bom e seguro, boa biodisponibilidade oral acompanhada da capacidade de redução da carga fúngica de *Candida* e *Aspergillus* (Shahid, 2016).

A cápsula de microrganismos também pode ser alvo de anticorpos, porém pouco se sabe sobre essa ligação já que é uma estrutura frágil e altamente hidratada. Um dos organismos encapsulados mais bem estudados e característicos por apresentar essa estrutura celular é o *C.neoformans*, no qual a cápsula é muito importante para a virulência. Anticorpos monoclonais capazes de se ligar glicuroxilomanana da cápsula mostraram alterações mecânicas na cápsula provocando sua rigidez o que impede a liberação de células novas (Cordero *et al.*, 2013). Muitos desses estudos demonstraram resultados promissores para a obtenção de novos antifúngicos, porém, atualmente, nenhum deles resultou em ensaios clínicos com resultados positivos (Vandeputte *et al.*, 2012).

Novas estratégias de busca de novas terapias antifúngicas que utilizam de forma racional o conhecimento do patógeno e do hospedeiros em tecnologias facilitam e reduzem o tempo de desenvolvimento de novos antifúngicos (Scorzoni *et al.*, 2017). Dessa forma, estudos utilizando imunoterapias, inclusive com anticorpos monoclonais contra alvos moleculares mais específicos ao patógeno podem ser promissores para a obtenção de antifúngicos que possam ainda chegar ao mercado. A imunoterapia é uma abordagem mais recente que tem demonstrado ser promissora envolvendo diferentes estratégias, como vacinas, ativação da resposta imune e indução da produção de moléculas antimicrobianas do hospedeiro, administração de citocinas e anticorpos monoclonais, porém não foram encontrados resultados confirmatórios com ações antifúngicas (Pappas, 2011; Scorzoni *et al.*, 2017).

Em *P.brasiliensis* o uso de anticorpos monoclonais contra uma proteína fosfatase ácida demonstrou a inibição do crescimento do fungo (Xander *et al.*, 2007). Estudos com anticorpos contra a proteína gp43 desse mesmo fungo demonstraram que alguns são capazes de reduzir a carga fúngica (Buissa-Filho *et al.*, 2008). Muitos desses estudos demonstraram resultados promissores para a obtenção de novos antifúngicos, porém, atualmente, nenhum deles resultou em ensaios clínicos com resultados positivos (Vandeputte *et al.*, 2012).

Estudos utilizando anticorpos monoclonais contra alvos moleculares mais específicos ao patógeno podem ser promissores para a obtenção de antifúngicos que possam ainda chegar ao mercado. Um fragmento de anticorpo monoclonal chamado Efungumab (Mycograb®), que atua contra a proteína HSP90 da parede celular e atua na tradução de sinais, foi testado como tratamento da candidíase, no entanto no ano 2007 a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) não autorizou a introdução do medicamento no mercado devido a insuficiência de dados relativos aos

efeitos adversos do anticorpo e sua segurança de uso nos pacientes (Tragiannidis *et al.*, 2013). Embora seres humanos tenham essa proteína em seu organismo, a HSP90 pode ser um bom alvo terapêutico devido a diferenças de suas sequências com as de fungos, evitando que haja interação entre os anticorpos antifúngicos gerados.

### **1.9 Imunoterapia de doenças infecciosas**

Nos Estados Unidos, anticorpos aprovados para uso terapêutico são utilizados principalmente contra câncer e doenças inflamatórias, sendo ainda restrito em doenças infecciosas ganhando destaque apenas nos últimos anos, depois do primeiro anticorpo aprovado, o Palivizumab, utilizado na prevenção da infecção pelo vírus sincicial respiratório. Posteriormente, foi produzido um anticorpo com mesmo efeito, o Motavizumab, porém devido a dificuldades regulatórias pelo FDA, a empresa AstraZeneca decidiu descontinuar a produção desses (Saylor *et al.*, 2009). Estudos foram realizados analisando a eficácia e segurança do medicamento e não foram conclusivos quanto a eficácia, apresentando resultados contraditórios (Lagos *et al.*, 2009; Feltes *et al.*, 2011; Ramilo *et al.*, 2014). Um teste realizado comparando o Palivizumab com o Motavizumab mostrou similaridade no perfil de segurança dos anticorpos em crianças suscetíveis ao vírus sincicial respiratório devido a doença congênita do coração (Feltes *et al.*, 2011). Um alvo importante para terapia é a proteção por anticorpos neutralizantes tendo como alvo proteínas de superfície do envelope viral (Burton *et al.*, 2012). Doenças bacterianas mediadas por toxinas são bons alvos para o uso de anticorpos monoclonais neutralizante de toxinas.

Estudos ao longo dos últimos vinte anos têm demonstrado que mAbs podem ajudar no controle de infecções bacterianas e fúngicas, além de ainda melhorar a ação de antimicrobianos por sinergismo com esses fármacos, possibilitando tratamentos mais eficazes destas infecções (Saylor *et al.*, 2009). O desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra doenças infecciosas pode se mostrar menos complexo do que câncer e doenças imunológicas devido as diferenças antigênicas entre o patógeno e o hospedeiro. Os anticorpos apresentam mecanismos de ação antimicrobianos direto, que inclui a neutralização de toxinas e ligação a vírus evitando a entrada na célula hospedeira, e, indireto, que envolve funções mediadas por Fc como modulação da resposta inflamatória, promoção da fagocitose e aumento dos efeitos mediados pelo complemento (Saylor *et al.*, 2009).

Nos últimos 20 anos, estudos mostraram que a administração de anticorpos monoclonais pode ser benéfica na infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Teitelbaum *et al.*, 1998; Hamasur *et al.*, 2004) Em 1996 um estudo gerou três anticorpos monoclonais que reconhecem a superfície do antígeno da bactéria e, em 1998, um deles foi testado demonstrando aumentar a sobrevivência de camundongos sem apresentar atividade bactericida, inibir a infecção e a replicação viral (Teitelbaum *et al.*, 1998). Um carboidrato da superfície externa de *M. tuberculosis* foi alvo para o desenvolvimento de um anticorpo específico capaz de proteger o organismo contra a infecção e prolongar sua sobrevivência possivelmente por bloquear a invasão celular da bactéria (Hamasur *et al.*, 2004).

A terapia da AIDS utilizando anticorpos poderia complementar a quimioterapia retardando a resistência aos antirretrovirais e assim melhorando a eficácia do tratamento (Saylor *et al.*, 2009). Existem duas gerações de anticorpos neutralizantes de HIV-1 contra sítios de vulnerabilidade do envelope (Klein *et al.*, 2013), a primeira gerou anticorpos contra as glicoproteínas gp120 e gp41, que demonstraram ser efetivos contra o vírus (Trkola *et al.*, 1996; Hessel *et al.*, 2009; Hessel *et al.*, 2010), mas são também autorreativos para o hospedeiro (Haynes *et al.*, 2005), enquanto a segunda geração resultou em anticorpos com alvo no sítio de ligação de CD4, N160 (Klein *et al.*, 2013). A administração de mAbs e de uma mistura de mAbs neutralizantes específicos para HIV-1 em primatas com sistema imune intactos, infectados com o vírus, mostrou a capacidade de redução da carga viral (Barouch *et al.*, 2013).

Estudos para o uso de anticorpos contra o vírus influenza também avançaram a partir da compreensão da estrutura da glicoproteína hemaglutinina e identificação de sítios de ligação nas décadas de 1980 e 1990 contra diferentes subtipos de vírus (Wiley *et al.*, 1981; Okuno *et al.*, 1993). Os vírus H5N1, H1N1 e H3N2 têm sido foco para a busca de anticorpos com capacidade neutralizantes e, para todos foram desenvolvidos anticorpos humanizados com essas características (Benjamin *et al.*, 2014; Shembekar *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2015). É importante o desenvolvimento de métodos que gerem e selecionem rapidamente anticorpos neutralizantes para a defesa contra patógenos virulentos. Um método desenvolvido foi a partir da imunização de macacos com vetores recombinantes adenovirais e a seleção por uma biblioteca de *phage display* derivada de células B e a sua humanização. Nesse estudo, foram obtidos mAbs com alta afinidade, alta potência neutralizante de forma rápida (Meng *et al.*, 2013).

Outro alvo para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais é o vírus da hepatite B e C. Alguns anticorpos têm sido estudados para o tratamento da doença e um dos resultados mostrou que anticorpos contra diferentes epítomos de um antígeno de superfície determinante da hepatite B são capazes de inibir o estabelecimento da infecção por HVB pela neutralização das partículas do vírus da hepatite B (Golsaz Shirazi *et al.*, 2014). Na hepatite C, anticorpos monoclonais humanos foram gerados com capacidade de reconhecer com alta afinidade o epítomo presente na glicoproteína E2 do vírus (Broering *et al.*, 2009). Anticorpos monoclonais para o tratamento da raiva também foram testados ao longo dos últimos anos. Em 2008, alguns dados do estudo de fase 1 de um coquetel de anticorpos monoclonais contra a raiva demonstraram atividade neutralizante contra o vírus (Bakker *et al.*, 2008)

Anticorpos monoclonais contra uma toxina de *Escherichia coli* Stx1 mostraram ter alta afinidade ao antígeno realizando a neutralização e assim, protegendo células da toxicidade do composto (Skinner *et al.*, 2014). O uso de terapias anti-toxina para o tratamento contra o *Clostridium difficile* também tem sido foco de estudos (Babcock *et al.*, 2006). Um estudo recente utilizando anticorpos monoclonais e policlonais possibilitou a obtenção de anticorpos contra uma de suas toxinas capazes de evitar a infecção (Steele *et al.*, 2013).

Anticorpos monoclonais que atuam em *Staphylococcus* sp. tem como alvo tanto a bactéria como também as toxinas que medeiam a doença (Saylor *et al.*, 2009). O ácido lipoteicoico é uma macromolécula importante presente na parede celular de *Staphylococcus* e foi um alvo para o desenvolvimento de um anticorpo humano quimérico, Pagibaximab, que chegou a estudos clínicos de fase II realizado em recém-nascidos. O anticorpo demonstrou ser seguro e bem tolerado, além de eficaz no tratamento da infecção nesses pacientes (Weisman *et al.*, 2011). Um dos principais determinantes de virulência envolvida na patogenicidade é a presença de alfa toxina capaz de formar poros provocando a morte celular. Anticorpos monoclonais com potente função inibidora de alfa toxina foram identificados e mostraram ter alta afinidade exercendo proteção contra vários isolados de *S. aureus*. Além disso, em modelo animal, o anticorpo demonstrou reduzir o tamanho da lesão provocada por dermonecrose, quando administrado 24h antes da infecção (Tkaczyk *et al.*, 2012).

Antígenos utilizados em imunoterapias não necessitam estar relacionados apenas a fatores de virulência, a maioria das vacinas contra infecções fúngicas invasivas, por exemplo, baseiam-se na proteção e indução de respostas Th1 ou Th17 mediadas por células pró-inflamatórias, que

melhoram a morte fagocitária do fungo; o que aumenta o repertório de antígenos disponível para uso (Perfect *et al.*, 2010; Scorzoni *et al.*, 2017). O interferon gama é uma importante citocina pró-inflamatória que já tem sido utilizada como terapia adjuvante quando há falha no tratamento antifúngico padrão por apresentar resultados positivos na eliminação do fungo no hospedeiro (Perfect e Bicanic, 2015).

O anticorpo 18B7, que atua contra a cápsula polissacarídica de *C. neoformans*, inicialmente apresentou testes contra a infecção pelo patógeno, porém atualmente, é muito utilizado em pesquisas científicas para estudos de interação patógeno hospedeiro do fungo (Nicola *et al.*, 2018). Os principais avanços em vacinas fúngicas são em relação a infecções de candidíase invasiva, atualmente duas vacinas promissoras estão em fase de testes clínicos (Shahid, 2016). A primeira, que já demonstrou eficácia em adultos saudáveis, está em fase IIa e tem demonstrado alta imunogenicidade reduzindo os episódios de infecção em pacientes com candidíase vulvovaginal recorrente com segurança em estudos controlados com duplo-cego e placebo (Edwards *et al.*, 2018). Ela contém um antígeno rAls3p-N, denominada NDV-3A que evita a adesão e invasão fúngica em hospedeiros imunizados, mediada por células T pelo recrutamento de neutrófilos e mediada por um anticorpo específico em hospedeiros vacinados (Shahid, 2016). Já a segunda vacina, que está em ensaio clínico é baseada em virossoma, com uma aspartil proteinase 2 incorporada a virossomas de influenza, denominada PEV7 contendo antígenos recombinantes imunogênicos, que demonstraram conferir proteção a animais imunizados, reduzindo a infecção pelo fungo (Vilanova *et al.*, 2004). O uso de vacinas contra a candidíase vaginal poderia ser vantajoso devido à natureza crônica e recorrente da doença melhorando a imunidade da mucosa e evitando a invasão pela *Candida* spp. Já no caso da candidíase invasiva, um potencial alvo seriam as vias celulares Th1 (Scorzoni *et al.*, 2017).

O uso de anticorpos monoclonais no tratamento de doenças infecciosas apresenta algumas limitações, como o alto custo e o uso clínico, já que sua administração é sistêmica via endovenosa. (Saylor *et al.*, 2009). Isso faz com que haja uma necessidade de que os pacientes estejam internados nos hospitais, portanto gera custos maiores ao sistema de saúde e torna-se menos viável a pacientes com menos gravidade. Os anticorpos são moléculas frágeis que necessitam ser conservados de maneira adequada em local refrigerado. Muitas doenças são tratadas através do exame clínico, sem o resultado de exames laboratoriais. No entanto, como os mAbs são para alvos específicos é necessário que seja realizado o diagnóstico da doença antes de iniciar o seu uso já que são ainda

mais efetivos no início da infecção (Saylor *et al.*, 2009). É importante que o médico avalie as condições do paciente com uma anamnese adequada e escolha a terapia que leve a um benefício maior do que o risco para o paciente. Anticorpos poderão ser utilizados como terapia única ou combinada com antibióticos que deverá ser determinada melhor de forma individualizada de acordo com a clínica do paciente.

### 1.10 Tiorredoxina Redutase (Trr1)

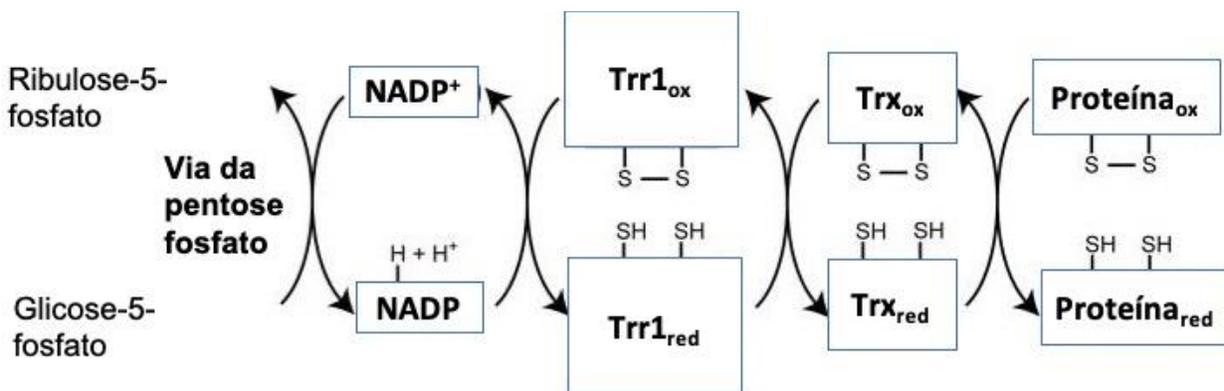
As proteínas do sistema tiorredoxina possuem origem em um ancestral comum nos organismos dos diferentes reinos sendo encontrada em organismos desde archae até mamíferos, cada um deles tendo sofrido um processo evolutivo distinto. Esse fato é justificado pela presença de tiorredoxina em organismos inferiores como os procariotos e ainda em eucariotos como os mamíferos, além de plantas, bactérias e leveduras (Holmgren, 1985). A proteína possui vários resíduos conservados nas proteínas tiorredoxinas que possuem função estrutural e catalítica importante como os de cisteína do sítio catalítico essenciais para a atividade da enzima e ainda outros resíduos importantes na capacidade termodinâmica e redox da enzima (Collet e Messens, 2010).

A sobrevivência dos organismos depende da manutenção da homeostase celular em que o meio intracelular é capaz de permitir o funcionamento adequado de todas as estruturas através do equilíbrio redox, evitando o estresse oxidativo e consequências mais graves como a perda de atividade de proteínas. O meio intracelular das células é um ambiente reduzido, no qual as resíduos de cisteínas são mantidos nessa forma por sistemas redox que catalisam reações de redução de ligações dissulfeto, sendo o principal deles o que envolve o complexo da tiorredoxina (Collet e Messens, 2010). O processo de redox celular funciona mantendo um tampão diante das situações de estresse, o como o da glutathione, que é um tiol de baixa massa molecular encontrado em pequenas quantidades dentro das células (Tan *et al.*, 2010).

O sistema de tiorredoxina é formado por dois tipos de enzima, a tiorredoxina e a tiorredoxina redutase, além do cofator NADPH (**Figura 11**). A primeira descrição da tiorredoxina foi realizada no ano de 1960 e quatro anos mais tarde, em 1964, a proteína foi isolada pela primeira vez em *E. coli* (Laurebt, Moore et al., 1964). Em 1975, foi descrita a primeira estrutura cristalográfica e tridimensional da tiorredoxina, que consiste em cinco folhas- $\beta$  rodeadas por quatro  $\alpha$ -hélices. Essa proteína atua como um fator regulador para enzimas ou receptores, podendo

servir de subunidade da DNA polimerase de vírus ou como um componente na montagem de pequenos vírus. Em um recente trabalho de doutorado da Cláudia Bravo, a estrutura cristalográfica da proteína de *C. neoformans* foi descrita e foi observado que pHs ácidos promovem maior mudança conformacional.

Estudos demonstraram o papel da tiorredoxina no controle do estresse osmótico e da apoptose (Arner e Holmgren, 2000). O sistema tiorredoxina atua ainda na defesa antioxidante do estresse oxidativo através da atividade dissulfeto redutase utilizando NADPH para a remoção de espécies reativas de oxigênio (Lu e Holmgren, 2014). Além disso, protegem as proteínas de agregação e inativação oxidativa, podem regular a morte programada das células, atuar como fator de crescimento, modular a resposta inflamatória e ainda promover o dobramento de proteínas (Collet e Messens, 2010). As próprias tiorredoxinas também podem sofrer oxidação e nesse caso, a enzima que atua em sua redução é tiorredoxina redutase, conhecida com Trr1 (Tan *et al.*, 2010). Foi observado ainda que embora mais raro, a Trr1 participa na redução de outros substratos como a glutaciona (Tan *et al.*, 2015).



**Figura 11: Reação catalítica do sistema de Tiorredoxina.** No sistema tiorredoxina ocorre um fluxo de elétrons a grupos ditiol das proteínas a partir de uma nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) formada pela via da pentose fosfato. Esse cofator por sua vez reduz a tiorredoxina redutase (Trr1) oxidada que se torna capaz de reduzir a tiorredoxina (Trx) que interage com um vasto repertório de proteínas intracelulares mantendo estado reduzido destas. (Lee *et al.*, 2013).

Os organismos foram capazes de desenvolver tiorredoxinas especializadas localizadas em compartimentos celulares diversos, podendo ser encontradas no citosol, núcleo, membrana, mitocôndria ou até mesmo serem secretadas ao meio extracelular (Collet e Messens, 2010). As tiorredoxina redutases se diferem entre os organismos, sendo que em eucariotos sua função é

semelhante à da glutathiona redutase enquanto em procariotos, a enzima age apenas em seu alvo principal (Arner e Holmgren, 2000). Em humanos foi identificada um único tipo de tiorredoxina redutase que pode ser encontrada em diversos órgãos e tecidos atuando em processos secretórios, regulação da atividade enzimática e até mesmo ação hormonal (Holmgren, 1985).

As tiorredoxinas redutases são enzimas oxidoredutases de dissulfeto de tiol com baixa massa molecular, contendo subunidades cerca 35-36 kDa, capazes de reduzir enzimas que foram oxidadas resultando na formação de dissulfeto (Thön *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2010). Essa enzima é membro da família de flavoenzimas diméricas que se liga ao dinucleotídeo de adenina flavina catalisando a redução da tiorredoxina com a transferência de elétrons do NADPH para um dissulfeto ativo, o que mantém o equilíbrio redox da célula (Williams *et al.*, 2000; Missall e Lodge, 2005; Abadio *et al.*, 2015).

O gene *Trr1* foi observado ser essencial para *C. neoformans* e suas proteínas demonstraram estar localizadas por toda a célula, com preferência para a mitocôndria (Missall e Lodge, 2005). Em *Aspergillus nidulans* a mesma essencialidade do gene foi observada e foram identificadas outras proteínas alvo do complexo tiorredoxina da célula, verificando que a presença do sistema redox é necessária para a redução de peróxido de hidrogênio realizado por catalases e peroxidases (Thön *et al.*, 2007).

Mutantes de *Trr1* mostraram um crescimento aeróbico lento que aumentou em condições anaeróbicas, além de serem sensíveis a ditioneitol (DTT) e exibirem uma ativação constitutiva de resposta a proteína desnaturada que é provocada pelo estresse do retículo endoplasmático (Toledano *et al.*, 2013). Esses mutantes apresentam ainda defeitos na tradução, agregação de ribossomos e sensibilidade a inibidores de tradução como higromicina. A quantidade de glutathiona, outro composto que atua no equilíbrio redox de tiol no citosol é bastante reduzida nesses mutantes (Kumar *et al.*, 2011).

A participação da tiorredoxina em distintos processos bioquímicos nos organismos possibilitou o entendimento de diferentes mecanismos moleculares, como a síntese de DNA e proteínas, estrutura e dobramento de proteínas, evolução, mecanismos enzimáticos, fotossíntese, endocrinologia, virologia e até mesmo o câncer (Holmgren, 1985). Atualmente, a enzima *Trr1* demonstra ser potencialmente um alvo molecular relevante para o desenvolvimento de novas moléculas antifúngicas, uma vez que é essencial para a maior parte dos fungos patogênicos. Estudos prévios identificaram três moléculas com atividade antifúngica contra este alvo molecular

Trr1 do patógeno *Paracoccidioides*. Os pesquisadores utilizaram uma estratégia computacional para busca de alvos contra a proteína Trr1, no qual foi gerado um modelo de sua estrutura 3D por modelagem molecular e submetido contra um banco de moléculas comercialmente disponíveis. As moléculas capazes de interagir com a proteína foram analisadas e doze foram selecionadas para serem sintetizadas e caracterizadas, resultando em três moléculas capazes de inibir espécies de *Paracoccidioides* (Abadio *et al.*, 2015). Resultados mais recentes obtidos na tese de doutorado da Claudia Bravo, mostraram duas moléculas com capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *C. neoformans* sem apresentar toxicidade, porém não apresentaram resultados de redução de carga fúngica em animais.

## 2. JUSTIFICATIVA

O crescimento da incidência de infecções por fungos nos últimos cinquenta anos junto ao prolongamento da expectativa de vida da população veio acompanhado por uma problemática em torno dos fármacos antifúngicos utilizados no tratamento. Após o desenvolvimento das principais classes de antifúngicos utilizadas atualmente no tratamento, pouco foi inovado na terapia de micoses. Os fármacos mais eficazes e utilizados apresentam alta toxicidade ao organismo do hospedeiro, como a nefrotoxicidade e hepatotoxicidade causada pela anfotericina B. Além disso, o intenso uso das mesmas classes medicamento contra fungos resultou na identificação de cepas com resistência (Jensen-Pergakes *et al.*, 1998; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Frente a dificuldade de tratamento e a alta morbi-mortalidade de infecções causadas por fungos, tornou-se necessária a busca por novas alternativas de tratamento. A utilização de imunoterapias permite respostas bastante específicas contra os respectivos alvos, além de fármacos nesse formato apresentarem meia-vida sérica longa e especificidade. Nos últimos anos, foram desenvolvidos diversos tratamentos de doenças utilizando anticorpos monoclonais, demonstrando ser uma tecnologia bastante promissora. O desenvolvimento de terapias antifúngicas baseada na resposta imunológica do hospedeiro e não apenas no patógeno tem sido investigado utilizando diferentes alvos moleculares. O uso anticorpos monoclonais contra micoses de grande importância e gravidade clínica pode ser uma alternativa de tratamento para esse tipo de infecção sendo mais seguro e eficaz para os indivíduos infectados que estejam internados e gravemente debilitados, minimizando os efeitos adversos provocados pelos atuais fármacos antifúngicos. Além disso, o uso de anticorpos parece ser vantajoso por atuar tanto nos microrganismos como na modulação do sistema imune, que está relacionado à capacidade do patógeno em se estabelecer no organismo do hospedeiro. Nosso grupo de pesquisa possui diferentes projetos de busca de terapias contra infecções fúngicas humanas utilizando alvos moleculares que afetem a sobrevivência do patógeno no hospedeiro. A Trr1 é um dos alvos estudados pelo grupo, e o objeto de estudo deste projeto é verificar a utilização desta proteína contra fungos patogênicos para desenvolvimento de imunoterapias. Anticorpos contra Trr1 como alvo de fungos patogênicos podem ser capazes de afetar a estrutura da parede celular do fungo deixando-o mais suscetível a outros antifúngicos e ao próprio sistema imune do hospedeiro. Foram escolhidos três patógenos *P. lutzii*, *C. albicans* e *C. neoformans* para o desenvolvimento de anticorpos que ligam às suas respectivas Trr1. Devido à similaridade entre as espécies de *Paracoccidioides* para a imunização, foi escolhido utilizar apenas

uma das espécies. O tratamento utilizando anticorpos monoclonais poderá resultar em uma nova estratégia para o tratamento e até mesmo profilaxia contra estas doenças.

### **3. OBJETIVOS:**

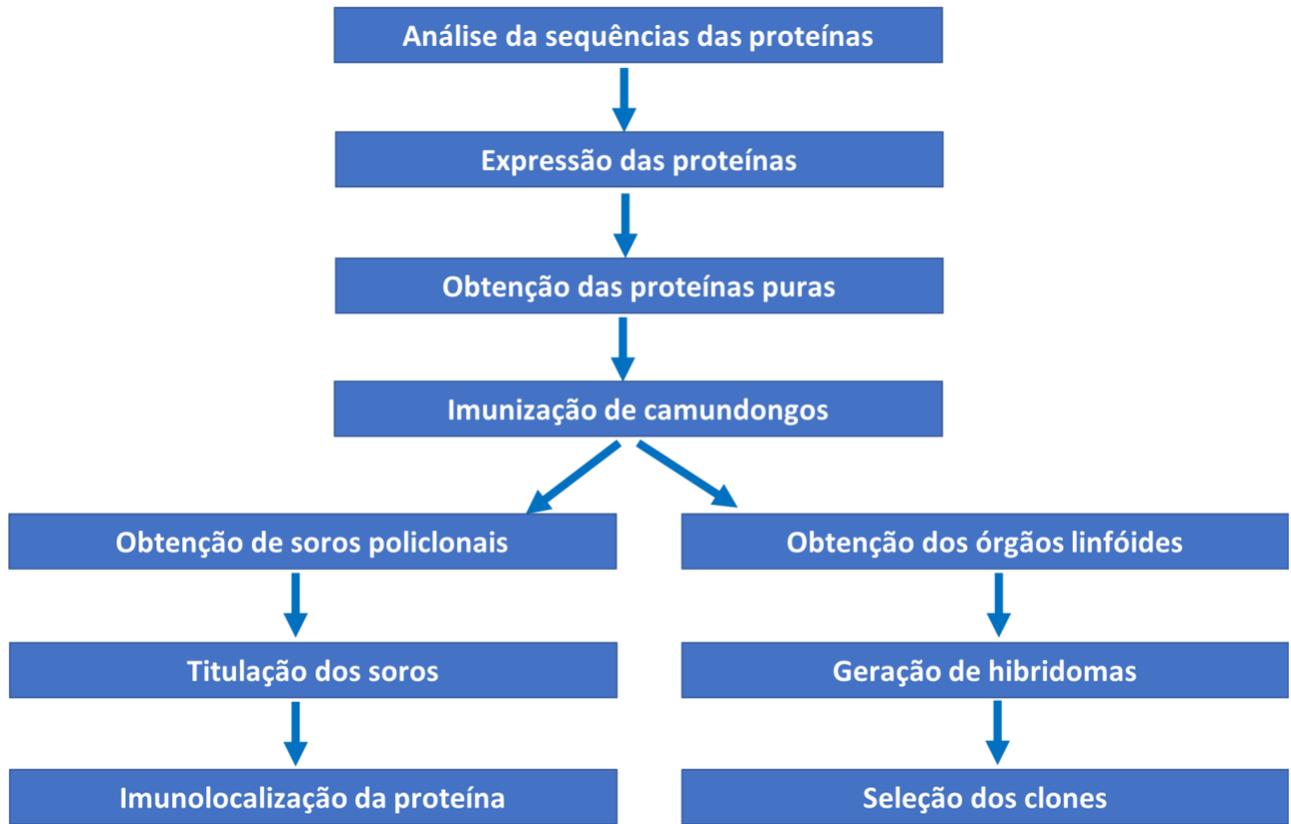
#### Objetivo Geral:

Investigar a capacidade imunogênica da proteína Trr1 na produção de anticorpos em camundongos e seu potencial uso como alvo-molecular para imunoterapia em fungos patogênicos humanos.

#### Objetivos Específicos:

- 1) Produzir proteínas recombinantes Trr1 puras de *P. lutzii*, *C. neoformans* e *C. albicans*.
- 2) Imunizar camundongos com as 3 proteínas Trr1 recombinantes obtidas a partir de expressão heteróloga em *Escherichia coli*.
- 3) Realizar a imunocitocalização das proteínas Trr1 em *P. lutzii*, *C. neoformans* e *C. albicans*.
- 4) Gerar hibridomas para a obtenção de anticorpos monoclonais contra a proteína Trr1.

## 4. ESQUEMA DO PROJETO



## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Linhagens de células

As linhagens trabalhadas estão representadas na **Tabela 4**. Para bactérias foram realizados estoques de cada uma em criotubos contendo uma mistura de 50% de LB líquido e glicerol 50%, e armazenados a -80°C. Para os fungos *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* foram realizados estoques de forma semelhante, substituindo o meio LB por YPD líquido. Esses estoques foram utilizados para o repique por esgotamento em placas de LB sólido (LB + ágar 1,5%) para bactérias por uma noite enquanto as de fungos foram incubadas por 3 dias em YPD sólido, todos a 37°C e foram armazenadas a 2-8°C como estoque pronto para uso por no máximo 15 dias. As colônias isoladas em cada uma das placas foram utilizadas diretamente em inóculos de meios líquidos, LB e YPD para bactérias e fungos, respectivamente. As linhagens de *Paracoccidioides* foram repicadas a cada cinco dias em meio Fava-Netto.

**Tabela 4. Linhagens de células utilizadas no trabalho**

LINHAGEM	ESPÉCIE
H99	<i>C. neoformans</i>
Pb01	<i>P. lutzii</i>
Pb18	<i>P. brasiliensis</i>
Sc3514	<i>C. albicans</i>
BL21(DE3)	<i>Escherichia coli</i>
DH5 $\alpha$	<i>Escherichia coli</i>

### 5.2 Vetor de expressão

O vetor de expressão escolhido para a clonagem dos genes das proteínas de interesse foi pET-21a (+) (*Novagen*), que está sob o controle transcricional do bacteriófago T7 (**Figura 12**).



### 5.3 Meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados com água destilada e esterilizados pela técnica de autoclavagem (120°C por 20 minutos) ou por filtração com membranas de 0,22µm.

- YPD:

Extrato de levedura                    1,0% (p/v)

Glicose                                    2,0% (p/v)

Triptona                                  2,0% (p/v)

pH= 5,6, esterilização por autoclavagem a 120°C por 15 min.

No caso de meio sólido adição de 1,5% de ágar.

- LB (*Luria-Bertani*)

Peptona de caseína                    1,0 % (p/v)

Extrato de Levedura                    0,5 % (p/v)

NaCl                                        1,0 % (p/v)

pH=7,2, esterilização por autoclavagem a 120°C por 15 min.

No caso de meio sólido adição de 1,5% de ágar.

- *Fava-Netto*

Proteose peptona                    0,3 % (p/v)

Peptona de caseína                    1,0 % (p/v)

Extrato de carne                        0,5 % (p/v)

NaCl                                        0,5 % (p/v)

Extrato de Levedura                    0,5 % (p/v)

Ágar                                         1,8 % (p/v)

q.s.p H<sub>2</sub>O                                90 %

pH=7,4, esterilização por autoclavagem a 120°C por 15 min.

Dissolver 4% de glicose em 10% do volume final de H<sub>2</sub>O e esterilizar por filtração.



## 5.4 Soluções e Tampões

- Tampão TEB 10X para gel de agarose:

Tris Base	0,89 M
Ácido Bórico	0,89 M
EDTA	0,02 M
pH=8,0	

- Tampão de amostra para gel de agarose 10x:

Tampão TEB 20X	50 % (v/v)
Glicerol	50 % (v/v)
Azul de Bromofenol	0,1 % (p/v)
Xileno Cianol	0,1 % (p/v)
pH=8,0	

- Tampão de corrida 5X para *SDS-page*:

Tris Base	15,2 g
Glicina	72,0 g
SDS	5,0 g
q.s.p	1 L
pH=8,3	

- Tampão de amostra 5X para *SDS-page*:

Tris Base	0,302 g
SDS	2,0 g
Azul de Bromofenol	0,025 g
Glicerol	10 mL
$\beta$ -mercaptoetanol	1mL
q.s.p	20 L

- Solução estoque de acrilamida para gel de proteína:

Acrilamida	30 %
Bis-acrilamida	0,8 %

- Tampão para gel de proteína (separador):

Tris Hcl	1,5 M
----------	-------

pH 8,8.

- Tampão para gel de proteína (concentrador):

Tris HCl	0,5 M
----------	-------

pH 6,8

- Solução corante para gel de poliacrilamida com *Comassie Blue* R-250.

Comassie R-250	0,25 %
Metanol	40 %
Ácido acético	10%
H <sub>2</sub> O	q.s.p

- Solução corante para gel de poliacrilamida com *Comassie Blue* G.

Comassie G	0,5 %
Metanol	30 %
Ácido acético	10%
H <sub>2</sub> O	q.s.p

- Solução descorante para gel de poliacrilamida.

Metanol	40 %
Ácido acético	10%
H <sub>2</sub> O	q.s.p

- Solução de Transferência para *Western-blot*

Tris base	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,037 %
Metanol	20 %

- Solução Bloqueadora para *Western-blot*

PBS	1X
Leite em pó	5 %

- APB

NaCl	100 mM
Tris – HCl pH 9,5	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

- Tampão de Eluição para purificação em coluna *Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare)*:

Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
pH=8,0	

- Tampão de Lise para purificação em coluna *Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare)*:

Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
pH=8,0	

- Tampão de Eluição para purificação em coluna *Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare)*:

Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	60 mM
pH=8,0	

- Tampão PBS

KCl	2,7 mM
NaCl	137 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10mM
pH=7,4	

- TBS 10X

Tris base pH 7.2	2 M
NaCl	5 M
NaN <sub>3</sub>	1 M

- Solução de Lavagem para ELISA

Tween 20	0,1 %
----------	-------

Em PBS ou TBS 1X

- Solução de Bloqueio para ELISA

BSA	1%
-----	----

- Tampão de Lise RIPA
 

NaCl	150 mM
EDTA pH 8,0	5 mM
Tris pH 8,0	50 mM
NP-40	1 %
Na Deoxicolato	0,5 %
SDS	0,1 %

### 5.5 Desenho dos genes para a produção de proteínas recombinantes de Trr1

A sequência da proteína Trr1 de *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida em seu respectivo banco de dados SGD *database* e foi utilizada na ferramenta BLASTP permitindo a obtenção das sequências nos fungos *C. neoformans*, *C. albicans*, *P. lutzii* e *A. fumigatus*. Baseado em um alinhamento entre as espécies, foi selecionada a sequência do gene para síntese química e posterior clonagem em vetor bacteriano.

### 5.6 Síntese dos genes-alvo:

Os genes-alvo TRR1 foram sintetizados quimicamente pela empresa *Epoch Biolabs* (*Missouri, Estados Unidos*) a partir de um desenho realizado pelo grupo no Laboratório de Biologia Molecular de acordo com os códons preferenciais de *E. coli*, contendo sítios de restrição para as enzimas XhoI e NdeI (*New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos*). O gene foi clonado no vetor de expressão bacteriano pET-21a(+) (*Novagen, Itabira, Brasil*) sob o controle transcricional da T7 RNA polimerase e confirmado por digestão pelas enzimas de restrição dos respectivos sítios mencionados (*New England BioLabs, Massachusetts, Estados Unidos*). Essas digestões foram observadas em gel de agarose 0,8% utilizando marcador (*1 Kb plus DNA Ladder – Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos*) e os plasmídeos foram então purificados utilizando kit *Qiagen plasmid Midi kit 100*. O vetor foi transformado em *Escherichia coli* BL21(DE3) para produção de proteínas recombinantes com 6X his-tag.

### **5.7 Geração de células eletrocompetentes e transformação por eletroporação**

Células BL21(DE3) em estoque a - 80°C foram plaqueadas e incubadas para o preparo das células eletrocompetentes. Foi realizado um pré inóculo de uma colônia isolada, incubado por 16 horas a 37 °C sob agitação de 250 rpm. Foi adicionado 2,5 mL da solução estoque de glicose 2 M, 2,5 mL da solução estoque de Mg 2 M e 1 mL do inóculo em dois tubos de 1 L contendo 250 mL de meio SB, que foram incubados a 37 °C sob agitação de 250 rpm até a OD atingir o valor de 0,35-0,4. Ao atingir a OD, os tubos foram transferidos para uma mistura de água gelo para que a cultura fosse resfriada rapidamente onde permaneceu por 30 minutos. Passado o tempo, a cultura foi centrifugada a 4 °C por 20 min a 3000 x g, então o sobrenadante foi descartado e ressuspenso em 25 mL de glicerol 10 % gelado e depois o volume foi completado até encher  $\frac{3}{4}$  do tubo. As células foram centrifugadas a 4 °C por 20 min a 3000 x g, o sobrenadante descartado. Por fim, as células ressuspendidas em 1 mL de glicerol 10% e foram feitas alíquotas de 50 µL que foram imediatamente congeladas em uma mistura de gelo seco com etanol e armazenadas a - 80 °C.

Cada alíquota das células eletrocompetentes foi utilizada para uma clonagem utilizando 5 ng de cada plasmídeo que foi adicionado delicadamente em cada frasco que teve o conteúdo transferido para cubetas previamente resfriadas entre os eletrodos de 0,2 cm (*BioRad, Califórnia, Estados Unidos*). O equipamento foi ajustado para resistência de 200 Ω, capacitância de 25 µF e voltagem para 1,8 kV. Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de meio SOC, as células foram ressuspendidas cuidadosamente, transferidas para um tubo de 15 mL e incubadas 37 °C por 1 hora sob agitação de 200rpm. Foram adicionados 10 µL e 100 µL da transformação em placas de LB contendo o antibiótico seletivo que foram incubadas a 37 °C por 12 a 16 horas e depois armazenadas a 4 °C

### **5.8 Indução e purificação das proteínas**

Após clonagem do vetor em células BL21(DE3) competentes, foram escolhidas aleatoriamente duas colônias transformantes na placa contendo ampicilina, a fim de verificar se eram de fato capazes de se serem induzidas para produção de proteínas recombinantes com 6x his-tag. Uma indução em pequena escala em 100mL de meio LB foi inicialmente realizada para observar a ocorrência da indução das proteínas de interesse e em caso positivo foi realizada uma indução em 2 L de meio com o mesmo clone. Para a indução foi realizado um pré-inóculo em pequeno volume no dia anterior que permaneceu crescendo por toda a noite a 37 °C sob agitação de 250 rpm com

o antibiótico seletivo. No dia seguinte, 5 % do volume do pré-inóculo foi utilizado para realizar o inóculo no volume total de indução, sem o antibiótico seletivo. As células permaneceram crescendo até que a OD 600 nm atingisse uma faixa de ótima entre 0,4-0,6 quando foi colocado IPTG estabelecido para a Trr1 de cada fungo (**Tabela 5**).

**Tabela 5: Concentração de IPTG para cada proteína**

PROTEÍNA	IPTG
Trr1 <i>C. abicans</i>	0,25 mM
Trr1 <i>P. lutzii</i>	0,5 mM
Trr1 <i>C. neoformans</i>	0,25 mM

As células durante a indução de pequena escala permaneceram por 24h a 30°C e 37 °C sob agitação de 250 rpm, sendo que foram retiradas amostras nos tempos de 2h, 4h, 6h e 24h para determinar o melhor o tempo de indução. Essas amostras retiradas foram centrifugadas por 5 minutos a 13000 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 25 µL de tampão de amostra 2X. Ao final da indução, a cultura foi centrifugada por 20 minutos a 4 °C a 8000 rpm, o sobrenadante foi descartado e armazenado a – 80 °C.

O precipitado foi ressuspenso em 10 mL de tampão de lise e rompidas utilizando o aparelho *Vibra Cell (Sonics)* com uma amplitude de 50 %, aplicando 10 pulsos de 10 segundos com intervalos de 1 min, sempre mantendo as amostras no gelo. Após a sonicação, o extrato foi centrifugado por 30 minutos a 4 °C a 8000 x g. No caso da purificação em pequena escala, o sobrenadante, contendo a proteína solúvel expressa foi transferido para a coluna contendo a resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow*, que posteriormente foi substituída pela *HisPur™ Cobalt Chromatography Cartridges (ThermoFisher, Massachusetts, Estados Unidos)* onde permaneceu sob orbital giratório por 1 hora e meia a 4 °C. Posteriormente, foi coletado 1 mL do sobrenadante e foram efetuadas três lavagens utilizando 4 mL do tampão de lavagem, sendo coletados 1mL de cada uma das lavagens. Por fim foram efetuadas seis eluições de 1mL. Posteriormente, foi realizada a etapa de eluição da proteína, onde foram realizadas cinco eluições com 1 mL, que foram coletados. Ao final a coluna foi lavada cinco vezes com água destilada e armazenada com álcool 20 % a 4 °C.

Já na purificação de larga escala, o procedimento foi realizado na coluna *HiTrap Talon Crude* 5mL de Cobalto no equipamento *Akta Avant* (GE, Little Chalfont, Reino Unido). A coluna foi lavada com um tampão 10 mM de imidazol com um fluxo de 3 mL/minuto. Em uma bomba ficou o tampão de fosfato sem o imidazol e na outra o tampão de fosfato com 500 mM de imidazol, o equilíbrio foi realizado com 2 % do tampão com imidazol em cinco volumes de coluna. A amostra não precisou ser filtrada e foi injetada em um fluxo de 1 mL/minuto. Para a eluição o fluxo foi de 3 mL/minuto e o sobrenadante e a lavagem foram recolhidos.

### 5.9 Verificação da expressão e purificação de proteínas em gel de poliacrilamida:

A fim de verificar se as proteínas foram expressas e se a purificação funcionou, foi preparado gel de poliacrilamida 12 % (**Tabela 6**) em sistema de mini géis montados no aparato de eletroforese (*Biorad, Califórnia, Estados Unidos*). Das amostras coletadas nos tempos de 2h, 4h, 6h e 24h, foram colocados no gel 10  $\mu$ L. O sobrenadante da lavagem e as eluições foram preparados com 4  $\mu$ L de tampão de amostra 5X e com 16  $\mu$ L de amostra e por fim, foram aplicados os 20  $\mu$ L no gel. Do marcador de massa proteica *SDS-Page Broad Range* (*Biorad, Califórnia, Estados Unidos*) foram utilizados 6  $\mu$ L. Antes de serem colocadas no gel, todas as amostras, incluindo o marcador, foram fervidos por 5 minutos e então centrifugados por mais 5 minutos a 13000g.

**Tabela 6: Composição de um gel de poliacrilamida**

COMPONENTE	1 GEL	
	SEPARADOR	CONCENTRADOR
Água Destilada	1,675 mL	1,525 mL
Tris HCl pH 8,8 1,5 M	1,2 mL	-
Tris HCl pH 6,8 0,5 M	-	0,625 mL
SDS 10%	50 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Acrilamida (acrilamida 30% + bis- acrilamida 0,8%)	2 mL	0,325 mL
TEMED	2,5 $\mu$ L	2,5 $\mu$ L
APS 10%	25 $\mu$ L	12,5 $\mu$ L

As condições da eletroforese foram de 35 V por 15 minutos até que as amostras entrassem na parte separadora dos géis e então a voltagem foi aumentada para 170 V até o final da corrida. Os géis foram então corados com *Comassie Blue* por no mínimo 2 horas sob leve agitação suficiente para mover o corante por cima do gel e depois descorados com solução descorante até que fosse possível a visualização do perfil proteico.

### 5.10 Concentração das proteínas e quantificação:

As proteínas foram concentradas por ultrafiltração em *Millipore's Centriprep*<sup>TM</sup> de 15mL, 10 kDa, que foi centrifugado a 2900 x g por 40 minutos o tanto de vezes que foi necessário de acordo com o volume total. Durante o processo, foi retirado todo o imidazol, substituindo o tampão por PBS 1X. A quantificação da proteína foi feita por espectrometria a 280 nm utilizando equipamento NanoDrop, o qual utiliza a massa molecular e o coeficiente de extinção molar para o cálculo da concentração da proteína (**Tabela 7**).

**Tabela 7: Coeficiente de extinção e massa molecular de cada uma das proteínas**

PROTEÍNA	COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR	MASSA MOLECULAR
Trr1 <i>C. abicans</i>	32680	35504,4
Trr1 <i>P. lutzii</i>	26150	38805,8
Trr1 <i>C. neoformans</i>	33015	398868,7

### 5.11 Imunização dos camundongos:

As proteínas recombinantes na quantidade de 50 µg foram emulsificadas em adjuvante *Freund*, que correspondeu a 50 % do volume. Inicialmente foi realizado um teste piloto de imunizações a fim de verificar o protocolo estabelecido para esse experimento que é divergente do preconizado para imunizações pois foram utilizadas três proteínas diferentes uma em cada imunização. Foram realizadas três imunizações em camundongos BALB/c fêmeas com 4 a 6 semanas de vida por via intradérmica, com duas semanas de intervalo cada uma. A primeira imunização foi realizada com adjuvante *Freund* completo enquanto a segunda e terceira

imunização foram realizadas com adjuvante *Freund* incompleto. Para o teste piloto, o volume total de inóculo em cada camundongo foi de 100  $\mu$ L aplicado nas costas, enquanto para a obtenção de hibridomas na primeira fusão a imunização foi realizada aplicando 30  $\mu$ L no coxim plantar de cada pata do animal e na segunda fusão foi realizado como no teste piloto. A cada imunização os animais foram sedados com isoflurano e foi retirada uma amostra de sangue máximo 40  $\mu$ L do seio retro orbital dos animais a fim de obter soro para a realização do teste de ELISA e verificar a produção de anticorpos. Ao final do teste piloto, os animais foram exsanguinados por punção intracardíaca após eutanásia por overdose de anestésico (cetamina 120 mg/kg, xilazina 20 mg/kg). No teste para obtenção de hibridomas, o camundongo com o título mais alto de anticorpos foi selecionado para dar continuidade aos experimentos e fazer a fusão de linfócitos com células de mieloma.

### 5.12 ELISA

Foi preparada uma solução da proteína purificada na concentração de 10  $\mu$ g/mL e 50  $\mu$ L desta foi adicionada a cada poço de uma placa de ELISA, que foi incubada a 37 °C por 1 hora. Passado o tempo, foi adicionado 200  $\mu$ L da solução de bloqueio com BSA a cada passo e a placa foi incubada a 37 °C por mais 1 hora. O conteúdo foi descartado e a placa foi lavada 3 vezes com TBST ou PBST e então foi adicionado 50  $\mu$ L de anticorpo primário, que foram os anticorpos gerados no experimento, poli ou monoclonais. As placas foram incubadas a 37 °C por 1 hora e lavadas três vezes com a mesma solução utilizada na lavagem anterior. Foi preparada uma diluição de 1:1000 de uma mistura de IgA, IgG e IgM como anticorpo secundário, dependendo de qual foi utilizado, que foi adicionada na quantidade de 50  $\mu$ L em cada poço e incubada a 37 °C por 1 hora. Por fim, o conteúdo foi retirado da placa e ela foi lavada cinco vezes com solução de lavagem. A revelação foi realizada preparando 5 mL de uma solução contendo comprimido de pNPP (*Sigma, Missouri, Estados Unidos*) e adicionando 50  $\mu$ L em cada poço da placa. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm.

No caso de diluir o anticorpo primário para realizar sua respectiva titulação foi adicionado nos poços da fileira A uma diluição de 1:100 do soro dos camundongos imunizados e 50  $\mu$ L de solução de bloqueio nos poços B-H Dessa forma foi realizada uma diluição seriada retirando 25  $\mu$ L dos poços A e assim consecutivamente até os poços da fileira G. Na fileira H, foram feitos poços de controle na qual não se adicionou diluição nenhuma de anticorpos como controle negativo. Os títulos dos anticorpos foram avaliados de acordo com os valores das ODs obtidas em

duplicata para cada diluição. O ponto de corte utilizado para os valores foi calculado baseado na média obtida dos valores de controle negativo adicionado ao valor do desvio padrão multiplicado por dois ( $MÉDIA + 2 \times DESVIO\ PADRÃO = VALOR\ DE\ CORTE$ ). Dessa forma os valores de OD positivos para serem avaliados na titulação foram aqueles maiores que o valor de corte calculado para cada placa de ELISA. O controle negativo utilizado na placa foi a adição de PBS no lugar do soro policlonal no momento do uso de anticorpo primário.

### 5.13 Obtenção de hibridomas

Foram realizadas duas fusões para obtenção de hibridomas. A primeira delas foi realizada no *Instituto Butantan* onde a técnica realizada utilizava a linhagem de células de mieloma Sp2/O, já a segunda foi realizada na *Johns Hopkins University* utilizando a linhagem de células de mieloma mantida pelo grupo que era a NSO. Ambas as células estavam em estoque de meio RPMI com 20 % de DMSO a - 80 °C e foram descongeladas para serem cultivadas até uma quantidade equivalente a três garrafas de cultura grandes para a fusão. As células de mieloma foram cultivadas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais e piruvato a 37 °C e a troca de meio foi realizada diariamente, além da transferência para outras garrafas sempre que necessário. Para a fusão, foram cultivadas duas garrafas grandes de mieloma.

No dia anterior foi realizado um *Feeder layer*, no qual foram retiradas células peritoneais de um camundongo BALB/c macho de 8 semanas e adicionadas à placa de cultura celular. O camundongo foi eutanasiado em câmara de CO<sub>2</sub>, imerso em etanol 70 % e sua pele foi descolada da membrana que reveste o peritônio. Foi injetado 5 mL de meio RPMI no abdome, que foi então massageado e com o auxílio de uma seringa, o líquido injetado foi recuperado e adicionado a 40 mL de RPMI. A mistura foi homogeneizada e distribuída pela placa de cultura celular de 96 poços que foi então incubada a 37 °C.

Para a fusão, o camundongo utilizado foi o de melhor título verificado por ELISA, que foi eutanasiado em câmara de CO<sub>2</sub> e imerso em etanol 70 % a fim de evitar contaminação no momento de abertura do abdômen. Para a primeira fusão retirou os linfonodos poplíteos que foram acondicionados em um frasco com meio RPMI com gentamicina. Já a segunda fusão retirou o baço dos animais. Posteriormente os órgãos foram transferidos para uma malha com coletor embaixo e limpos, retirando todo o tecido adiposo externo. O meio RPMI foi injetado a fim de inflar os órgãos que foram macerados para liberar os linfócitos. As células foram então centrifugadas a 250 x g por

5 min a 37 °C e ressuspendidas em 10 mL de meio RPMI. A contagem do número de linfócitos foi realizada em câmara de *Neubauer* e para a fusão foi utilizada uma quantidade de 1 linfócito para cada 2 células de mieloma. Essa mistura foi colocada em um frasco de 50 mL e centrifugada a 250 x g por 5 min e então o sobrenadante descartado. Esse tubo foi colocado em banho maria a 37 °C para a fusão utilizando polietilenoglicol (PEG) 1500 com 50 µL de DMSO gotejado durante 1 minuto sob agitação manual. Após esse processo as células foram mantidas em repouso por mais 1 minuto e então foram adicionados 2 mL de RPMI sem soro por 1 minuto seguido por 20 mL do meio por 4 minutos. Um novo repouso de 4 minutos foi realizado e as células foram centrifugadas a 250 x g por 5 minutos e ressuspendidas em 40 mL de meio RPMI contendo 15 % de soro fetal bovino, 2 % HAT, 2 % de aminoácidos não essenciais, 1 % de piruvato e 30 µg/mL de gentamicina. Essa suspensão foi distribuída nos poços de placas de 96 poços na quantidade de 100 µL. As placas foram armazenadas em estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Diariamente as células foram monitoradas e a cada dois dias foi realizada a troca de um novo meio. Após uma semana o HAT foi trocado por HT que permaneceu em uso no meio por mais duas semanas e após esse período as células foram mantidas em meio RPMI com 15% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais, piruvato e gentamicina 30 µg/mL. Após cerca de 10 dias da fusão o sobrenadante dos hibridomas foram testados por ELISA a fim de verificar os clones positivos que foram expandidos e clonados por diluição limitante de forma a obter 5 células por mL. Os poços com crescimento de um único clone foram expandidos e armazenados a -80 °C.

#### **5.14 Obtenção dos extratos proteicos**

Os extratos proteicos do citosol e superfície da célula de cada um dos fungos e de células de mamíferos foram obtidos de culturas novas. As espécies de *Paracoccidioides* permaneceram crescendo por 5 dias em meio *Fava-Netto* a 37°C e após esse tempo a cultura foi raspada e ressuspendida em Tris-HCl 10 mM pH 7,4. As células de *C. albicans* e *C. neoformans* cresceram por 48 horas em meio YPD sob agitação de 250 rpm a 37 °C e foram centrifugadas a 8000 x g por 10 minutos a 4 °C para a remoção do meio e ressuspendidas em Tris-HCl 10 mM pH 7,4. Todas as células foram então lavadas cinco vezes com 20 mL de água gelada e centrifugadas a 8000 x g por 5 minutos a 4 °C. Por fim, as células foram ressuspendidas no tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 contendo inibidores de protease e foi adicionado um volume igual de pérolas de vidro. Os tubos foram agitados em *vórtex* durante 30 segundos com intervalos de 3 minutos seis vezes e então

foram centrifugados a 3000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi guardado a temperatura de – 80 °C. O precipitado foi lavado cinco vezes com água gelada e depois uma vez com tampão de PMSF 1 mM com 5 % de NaCl, 2 % de NaCl e 1 % NaCl. As proteínas foram extraídas utilizando tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 0,1 M, SDS 2 %, DTT 10 mM que foi adicionado e então fervido por 10 minutos. Por fim, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado a de – 80 °C. Os extratos das células de mamíferos foram obtidos apenas do citosol, de forma semelhante, porém ao invés de utilizar o tampão de Tris-HCl 10 mM pH 7,4, foi utilizado o tampão RIPA.

### 5.15 Aspectos Éticos

Os experimentos no Brasil foram realizados nos biotérios da Universidade Católica de Brasília, da Universidade de Brasília e Instituto Butantan com o protocolo de ética número 018/13 aprovado na Universidade Católica de Brasília sob o título “*Geração de anticorpos monoclonais e policlonais em camundongos contra os antígenos HSP90, TRR1, ERG6 e KRE2*” sendo a saúde dos camundongos verificada por veterinários nesses locais durante a semana e a eutanásia de responsabilidade dos técnicos responsáveis pelo local.

Nos Estados Unidos, na *Johns Hopkins University*, a aprovação de uso de animais em experimentos requer aprovação do comitê de ética para o experimento, que foi obtida apresentando o protocolo com o nome “*Mechanisms of antibody-mediated protection against Cryptococcus neoformans*”, no qual foi descrita a metodologia, com número MO15H134. Além disso, a aprovação de uso exige a capacitação do usuário por curso de aprendizado de manuseio de animais “*Animal Care and Use*”. No biotério os animais receberam cuidado diário e foram vistoriados por veterinários que notificavam os usuários e orientadores caso os animais demonstrassem sinais e sintomas incomuns de doenças ou sofrimento. Ao final dos experimentos os usuários eram responsáveis pela eutanásia os animais que foi realizada por asfixia em câmara de CO<sub>2</sub> com aumento gradual do gás e ao final, deslocamento cervical para certificar a morte dos animais. Esses animais foram descartados em sacos plásticos devidamente identificados e levados a câmara fria do biotério que se responsabilizava pelo destino.

### 5.16 *Western-blot*

A fim de verificar a presença das proteínas nos fungos estudados, os extratos protéicos do citosol e da membrana foram submetidos a western blot utilizando os anticorpos policlonais obtidos na imunização dos camundongos. Foram corridos dois géis, um que foi corado e outro que foi submetido ao western-blot. Ao terminar a corrida, foi realizada a transferência utilizando o equipamento *Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Biorad, Califórnia, Estados Unidos) para uma membrana de nitrocelulose (*Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido*).

O sistema de transferência foi montado colocando, respectivamente um papel de filtro, a membrana, o gel de poliacrilamida e outro papel de filtro, sendo todos molhados em tampão de transferência. As bolhas foram cuidadosamente retiradas e o sistema foi submetido uma corrente elétrica de 15 V durante 15 min. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio preparada com leite e PBST 1X por 1 h a temperatura ambiente, sob leve agitação. A membrana foi lavada três vezes com PBST 1X por 5 minutos sob leve agitação e então, incubada com uma diluição de 1:1000 do soro de anticorpos policlonais durante 1 hora a temperatura ambiente, sob leve agitação. Passado o tempo, a membrana foi lavada novamente 3 vezes com PBST 1X por 5 minutos e foi adicionado o anticorpo secundário monoclonal anti-polyHis conjugado com fosfatase alcalina (*Sigma, Missouri, Estados Unidos*) na diluição 1:1000 em solução PBS 1X por 1 hora e meia a temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada sete vezes por 5 minutos cada com PBST 1X. Por fim, a membrana foi lavada com APB e as soluções reveladoras NBT e BCIP (*Sigma, Missouri, Estados Unidos*) foram colocadas e a membrana permaneceu sendo agitada até o aparecimento das bandas. A membrana então foi lavada com água destilada, seca a temperatura ambiente e armazenada em papel alumínio.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Análise das sequências de Trr1 de fungos patogênicos

As sequências da proteína Trr1 dos fungos *C. albicans*, *C. neoformans*, *P. lutzii* e *Aspergillus fumigatus* foram obtidas pela ferramenta BlastP a partir da sequência da tiorredoxina redutase de *Saccharomyces cerevisiae* depositada no banco de dados do fungo por ser uma levedura amplamente estudada. O alinhamento com a sequência de *A. fumigatus* foi realizado a fim de observar se a proteína de um fungo patogênico encontrado em sua forma filamentosa e de relevância clínica que não foi foco do estudo, poderia ser alvo de um fármaco de largo espectro por sua semelhança com as proteínas de outros fungos (**Figura 13**).

A escolha do alvo de Trr1 para esse estudo foi baseada nos estudos prévios já obtidos pelo grupo de identificação de genômica comparativa observando a proteína em diversos fungos patogênicos. Outro fator que despertou mais interesse no estudo desse alvo foi a obtenção, no mesmo grupo, de resultados promissores de efeitos antifúngicos com moléculas sintetizadas tendo como alvo a Trr1. No entanto, a similaridade das proteínas entre fungos patogênicos de relevância clínica e de interesse no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas ainda não havia sido analisada por alinhamento de resíduos de aminoácidos.

Observou-se semelhança entre as cinco proteínas analisadas, com regiões compostas por resíduos de aminoácidos comuns a todas elas, demonstrando similaridade da Trr1 entre fungos de diferentes espécies e filos. A análise da sequência de Trr1 de todos os fungos demonstra que ela é conservada entre as espécies aumentando as chances de que uma terapia antifúngica possa atuar contra diferentes fungos (**Tabela 8**). O Query cover do alinhamento da sequência de Trr1 de *S. cerevisiae* com os demais fungos foi bastante alto, de 99% com e-value baixos, porém com identidade variando entre 66%, correspondente a sequência de *A. fumigatus* e 80% com a de *C. albicans*. A maior identidade com a sequência de *A. fumigatus* foi a de *P. lutzii* com 75% e query cover de 98%; e a menor foi de 67% com *C. albicans* e query cover de 98%. Os três fungos do estudo foram também alinhados aos pares a fim de obter a similaridade entre as suas respectivas Trr1, e embora *C. neoformans* e *P. lutzii* tenham apresentado um alinhamento de 99% da sequência, a identidade com *C. albicans* foi de apenas 69% e 67% respectivamente. Entre as proteínas, a maior identidade foi de 70% entre *P. lutzii* e *C. neoformans*, com query cover de 91%.

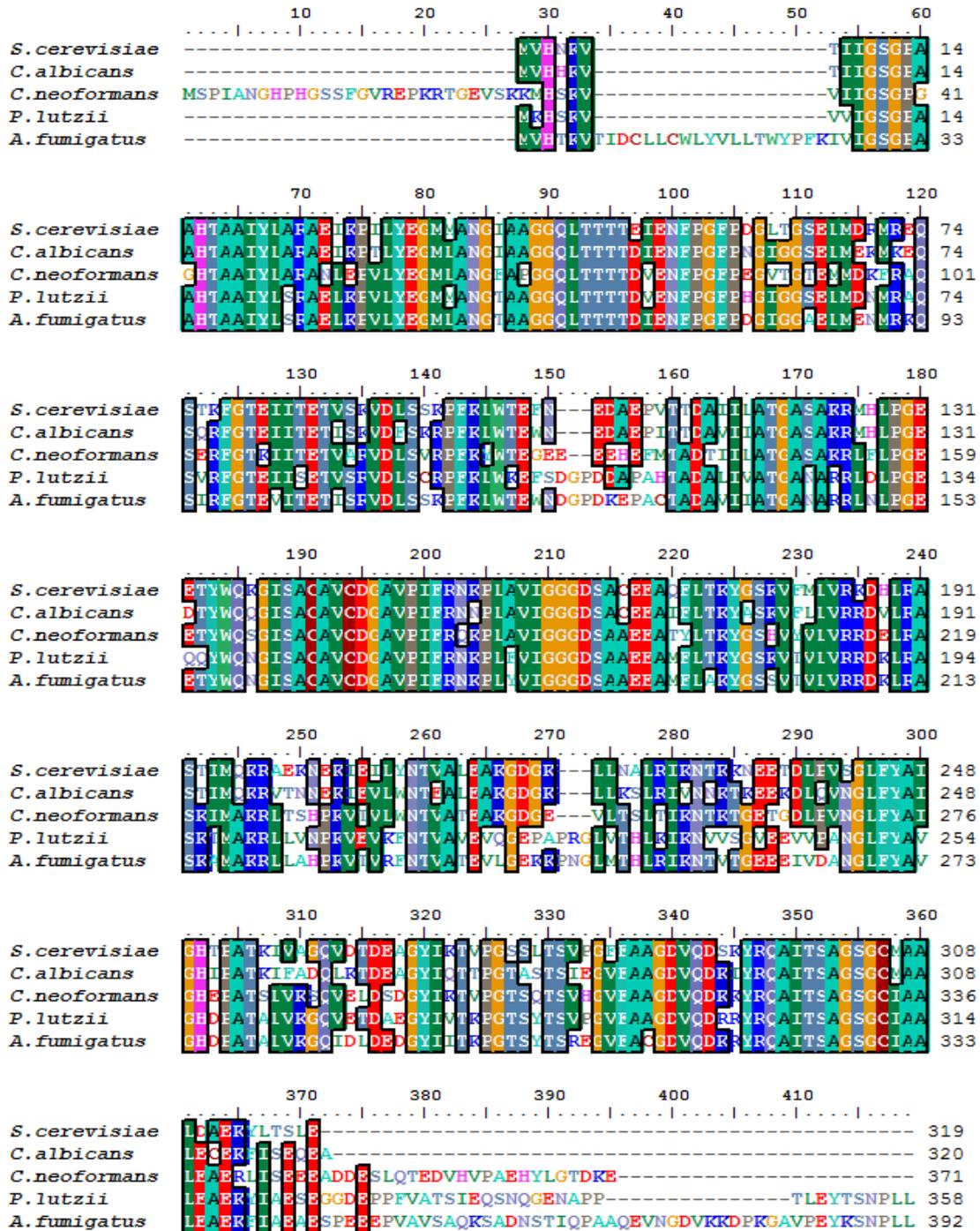


Figura 13: Alinhamento entre as sequências de Trr1 de diferentes espécies de fungos. A sequência de Trr1 de *S. cerevisiae* foi utilizada na ferramenta BlastP para a busca dessas proteínas nos fungos estudados, *C. albicans*, *C. neoformans* e *P. lutzii*. A sequência de *A. fumigatus* foi acrescentada no alinhamento a fim de verificar se esse patógeno de relevância clínica, que possui mais proximidade ao gênero *Paracoccidioides* que aos demais, poderia apresentar similaridade às demais proteínas. Baseado no alinhamento, foi possível observar regiões da sequência de proteína que são altamente conservadas entre as espécies.

**Tabela 8: Similaridade das proteínas de Trr1 de fungos de diferentes espécies**

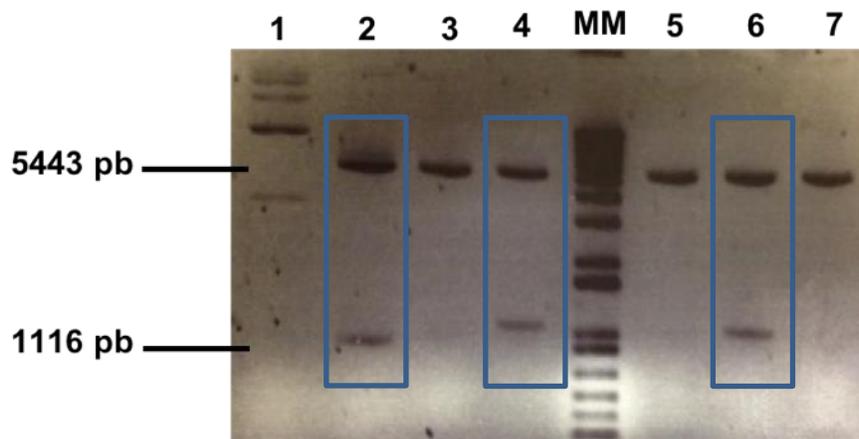
<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>P. lutzii</i>	<i>A. fumigatus</i>
<b>Total Score</b>	539	464	461	448
<b>Query Cover</b>	99%	99%	99%	98%
<b>E-value</b>	0.0	5e-164	1e-162	1e-156
<b>Identity</b>	80%	70%	69%	66%

<i>C. neoformans</i>	<i>P. lutzii</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>P. lutzii</i>
<b>Total Score</b>	456	<b>Total Score</b>	461	444
<b>Query Cover</b>	91%	<b>Query Cover</b>	99%	99%
<b>E-value</b>	1e-159	<b>E-value</b>	3e-162	1e-155
<b>Identity</b>	70%	<b>Identity</b>	69%	67%

## 6.2 Obtenção dos vetores de expressão dos genes das proteínas alvo

Os cDNAs dos genes de interesse foram sintetizados e clonados no plasmídeo pET-21a (+) para que as proteínas tivessem uma cauda 6x His permitindo a purificação utilizando cromatografia de afinidade. Os plasmídeos foram transformados em DH5 $\alpha$  para amplificação. A fim de confirmar a transformação foi realizada mini prep para obtenção dos plasmídeos e a digestão desses, com as enzimas de restrição XhoI e NdeI, gerando fragmentos de 5443 pb e de 1116 pb (**Figura 14**).

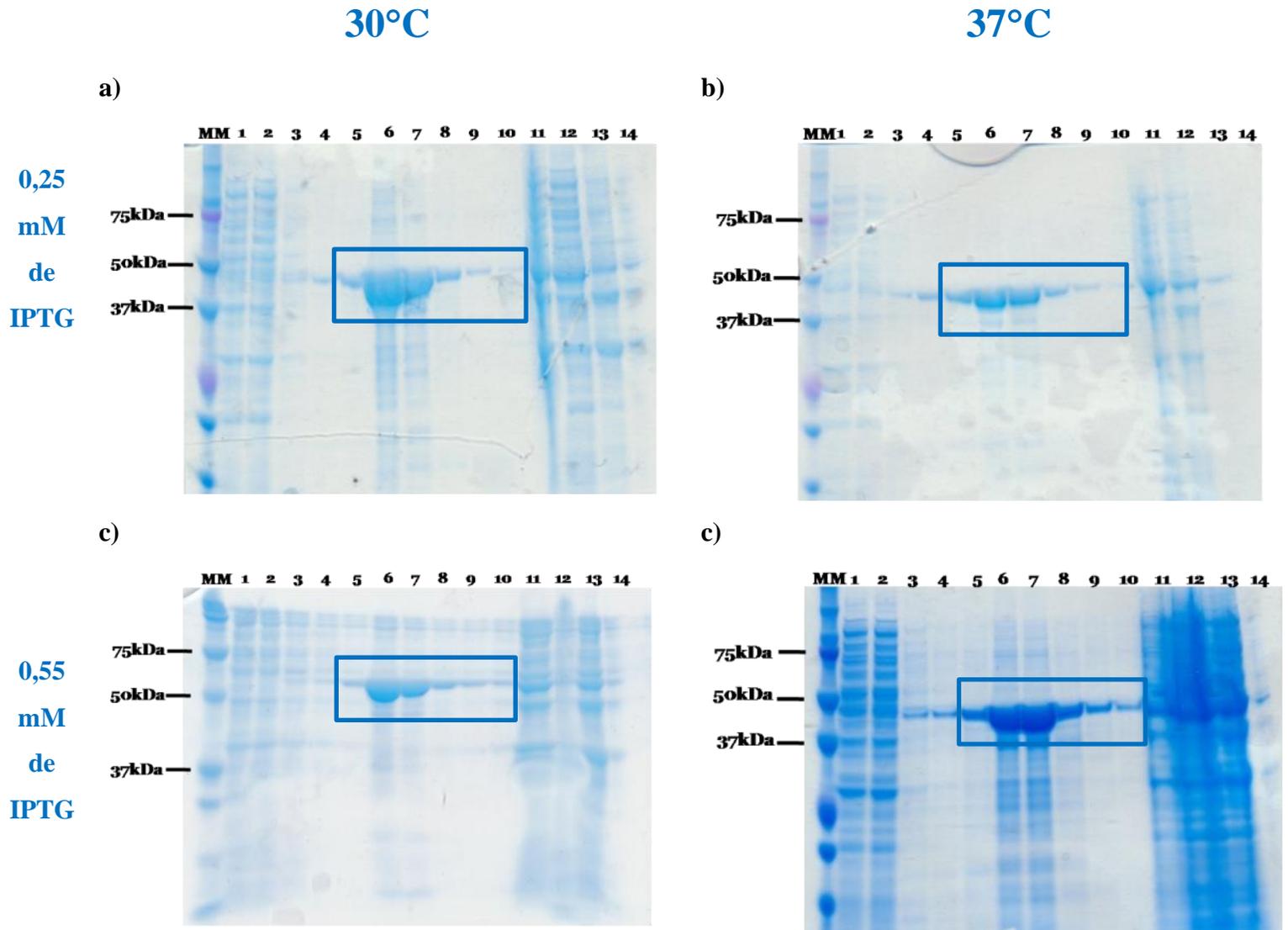


**Figura 14: Digestão dos plasmídeos obtidos após transformação dos genes em DH5 $\alpha$ .** A clonagem dos genes codificando as proteínas Trr1 de *C. neoformans*, *C. albicans* e *P.lutzii*. foi realizada em um plasmídeo pET-21a (+) que foi transformado em células DH5 $\alpha$  para sua amplificação. Plasmídeos em grande quantidade foram obtidos utilizando midi prep e confirmados por digestão com as enzimas de restrição XhoI e NdeI, originando fragmentos de 5443 pb + 1116 pb. O plasmídeo não digerido pode ser visualizado no número 1 possuindo aproximadamente 6,5 Kb, seguido no número 2 pela digestão de contendo a sequencia de TRR1 de *C. albicans*, de *C. neoformans* (número 4) e *P. lutzii* número 6), o marcador de 1 Kb ladder plus (*ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos*). Números 3,5 e 7 se referem a digestão de plasmídeo com a sequencia de TRX1, o alvo da proteína Trr1, porém é um fragmento pequeno de 315 pb, que não é visualizado nesse gel.

### 6.3 Expressão heteróloga de Trr1 em *E. coli* e purificação das proteínas recombinantes

Após a confirmação, os plasmídeos foram transformados em BL21(DE3) para a obtenção das proteínas. Foi realizada a expressão das proteínas recombinantes e sua indução de acordo com o tempo e concentração de IPTG observado em testes. Foi observado uma maior obtenção de proteína Trr1 de *C. neoformans* na indução por 24h a 37°C na concentração de 0,25mM de IPTG (**Figura 15a-d**). No caso de Trr1 de *C. albicans* o resultado a 30°C foi melhor que a 37°C, porém, o aumento da concentração de IPTG de 0,25mM para 0,5mM não demonstrou alteração significativa na quantidade de proteína purificada (**Figura 16a-d**). Por fim, a proteína Trr1 de *P. lutzii* também demonstrou resultados similares em ambas as concentrações de IPTG a 30°C (**Figura 17a-d**). A escolha da melhor condição para indução baseou-se na quantidade de proteína obtida e no uso de menor quantidade de IPTG, portanto nas condições em que o rendimento de proteína foi alto em duas concentrações do indutor, optou-se por utilizar aquela com menos reagente. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade em colunas de cobalto

por gravidade e então concentradas e dialisadas para o tampão PBS para que fossem quantificadas e verificadas em gel de poliacrilamida a sua pureza (**Figura 18**).

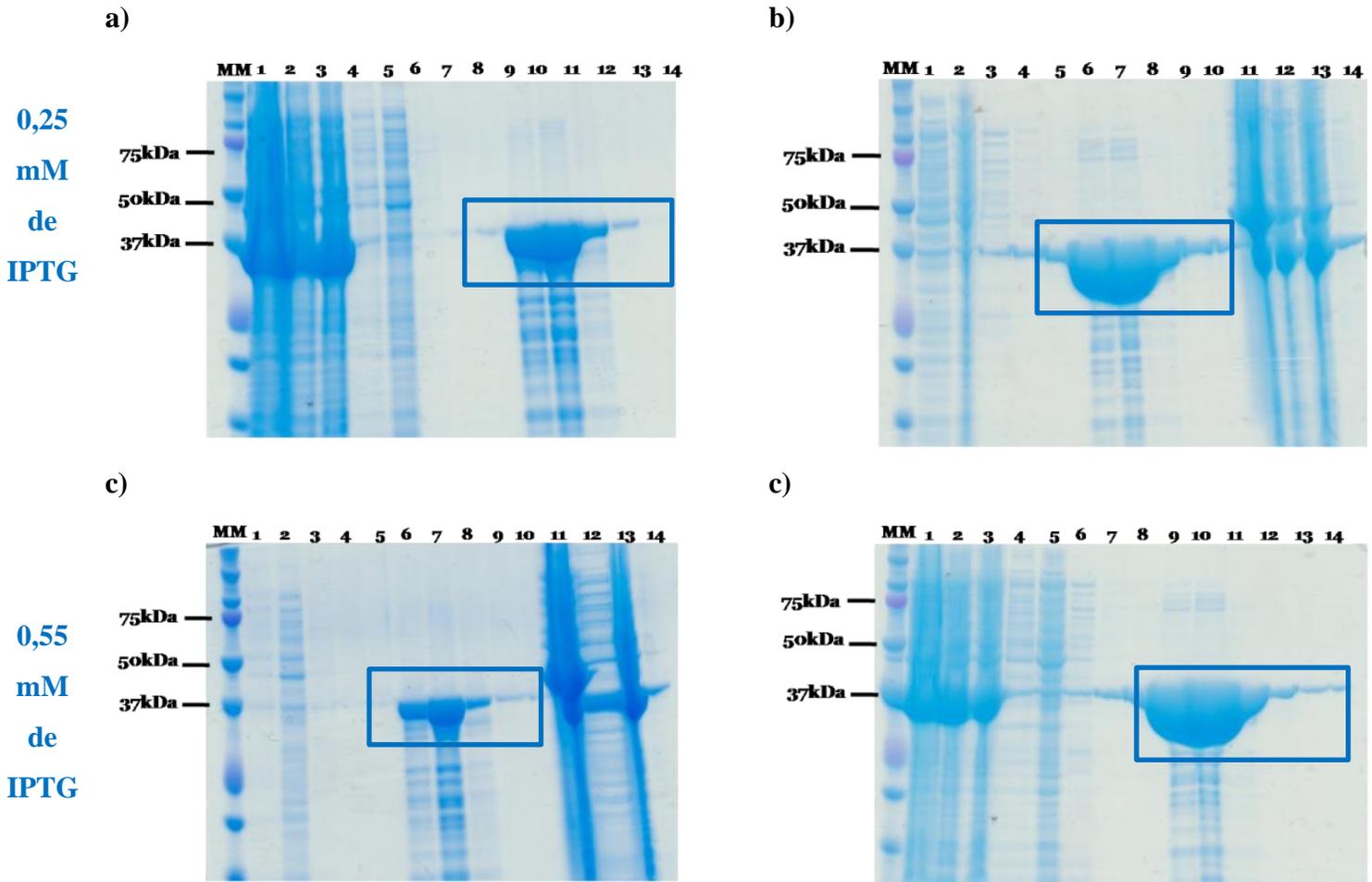


**Figura 15: Expressão, indução, otimização e purificação de de Trr1 de *C. neoformans* em diferentes tempos de indução e concentração de IPTG.**

As células foram induzidas a 30°C e 37° de temperatura e utilizando 0,25 ou 0,5 mM a fim de verificar a melhor condição para a produção de Trr1 de *C. neoformans*, que demonstrou ser utilizando 0,25 mM a 37°C (Figura A) Indução de Trr1 utilizando 0,25mM de IPTG a 37° (Figura A: ) e 30°C (Figura B) e de 0,5mM de IPTG a 37°C (Figura C) e a 30°C (Figura D). MM- marcador molecular, 1 – flow throw – FT, 2 a 4 – lavagens, 5-10 – eluições, 11 – tempo 0, 12 – tempo 2 horas, 13 – tempo final).

30°C

37°C

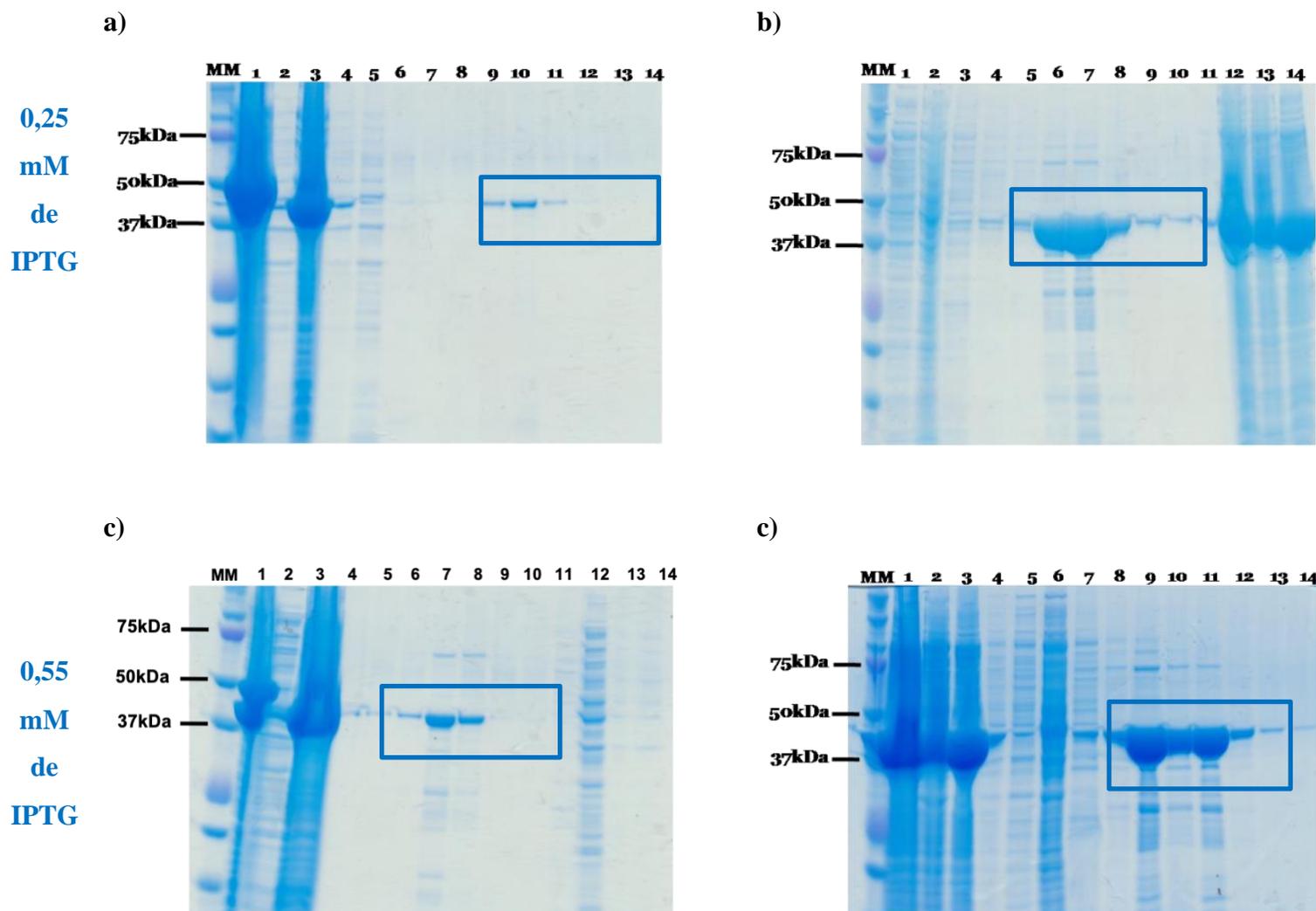


**Figura 16: Expressão, indução, otimização e purificação de de Trr1 de *C. albicans* em diferentes tempos de indução e concentração de IPTG.**

As células foram induzidas a 30°C e 37° de temperatura e utilizando 0,25 ou 0,5 mM a fim de verificar a melhor condição para a produção de Trr1 de *C. albicans*, que demonstrou ser bem maior na temperatura de 30 °C utilizando 0,25 mM (Figura B) ou 0,5 mM (Figura D). Indução de Trr1 utilizando 0,25mM de IPTG a 37° (Figura A) e 30°C (Figura B) e de 0,5mM de IPTG a 37°C (Figura C) e a 30°C (Figura D). **Figuras A e D:** MM- marcador molecular, 1 – tempo 0, 2 – tempo 2 horas, 3 – tempo final, 4- flow throw – FT, 5 a 7 – lavagens, 8 a 14 – eluições. **Figuras B e C:** MM- marcador molecular, 1 – flow throw – FT, 2 a 4 – lavagens, 5-10 – eluições, 11 – tempo 0, 12 – tempo 2 horas, 13 – tempo final.

30°C

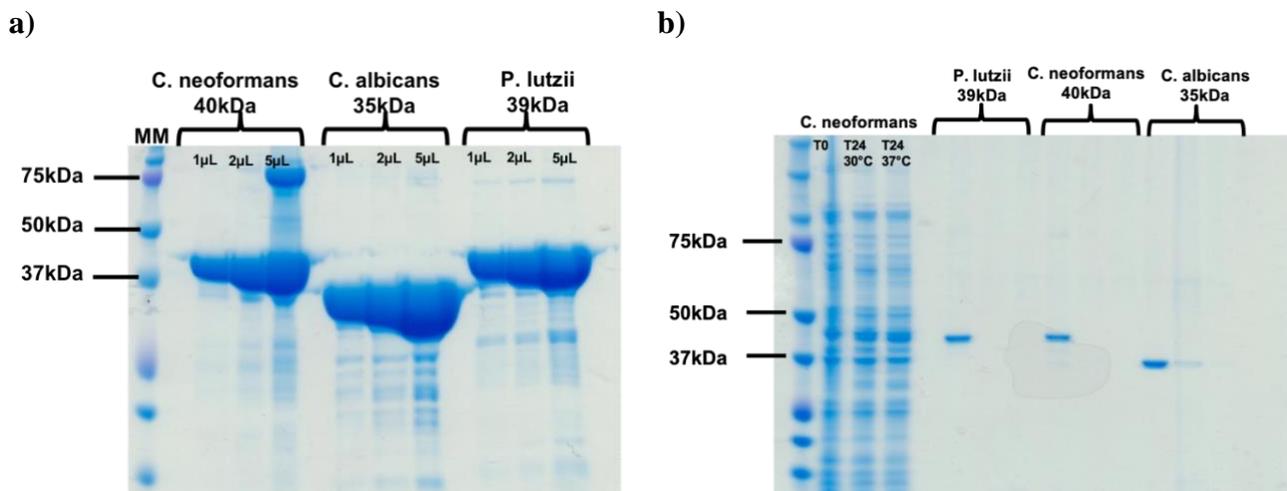
37°C



**Figura 17: Expressão, indução, otimização e purificação de Trr1 de *P. lutzii* em diferentes tempos de indução e concentração de IPTG.**

As células foram induzidas a 30°C e 37° de temperatura e utilizando 0,25 ou 0,5 mM a fim de verificar a melhor condiçãp para a produção de Trr1 de *P. lutzii*, que demonstrou ser melhor nas temperaturas de 30°C, tanto aa 0,25 mM (Figura B) quanto a 0,5 mM. Indução de Trr1 utilizando 0,25mM de IPTG a 37° (Figura A) e 30°C (Figura B) e de 0,5mM de IPTG a 37°C (Figura C) e a 30°C (Figura D). **Figuras A e D:** MM- marcador molecular, 1 – tempo 0, 2 – tempo 2 horas, 3 – tempo final, 4- flow throw – FT, 5 a 7 – lavagens, 8 a 14 – eluições. **Figura B:** MM- marcador molecular, 1 – flow throw – FT, 2 a 4 – lavagens, 5-10 – eluições, 11 – tempo 0, 12 – tempo 2 horas, 13 – tempo final. **Figura B:** MM- marcador molecular, 1 – tempo 0, 2 – tempo 2 horas, 3 – tempo final, 4 – vazio, 5-10 – eluições, 11 a 13 – lavagens, 14 – flow throw

A proteína de Trr1 de cada um dos fungos *C. neoformans* e *C. albicans* foi obtida pela mesma técnica de purificação, no entanto observou-se que a produção de cada proteína apresentou características únicas que não devem ser sobrepostas a outras. Os parâmetros para a expressão e purificação das proteínas devem ser avaliados individualmente para a proteína de cada organismo. A quantidade obtida de proteína de cada espécie a partir do mesmo volume de meio foi bastante diferente, Trr1 de *P. lutzii* apresentou 13,3 mg/mL, de *C. neoformans* 21,9 mg/mL e de *C. albicans* 34,2 mg/mL, o que demonstra que apesar das proteínas apresentarem semelhanças na sequência, a produção de cada uma delas ocorre de maneira diferente.



**Figura 18: Proteínas de Trr1 dos três fungos após purificação.** Amostras de Trr1 dos três fungos demonstram alto rendimento e grau de pureza utilizando a técnica de cromatografia de afinidade em colunas de cobalto com que levou à obtenção de 21,1 mg/mL de *C. neoformans*, 34,2 mg/mL de *C. albicans* e 13,3 mg/mL de *P.lutzii* (A). A proteína de Trr1 de *P. lutzii* é identificada no gel de poliacrilamida no tamanho de aproximadamente 39 kDa, *C. neoformans* 40 kDa e *C. albicans* 35 kDa (B).

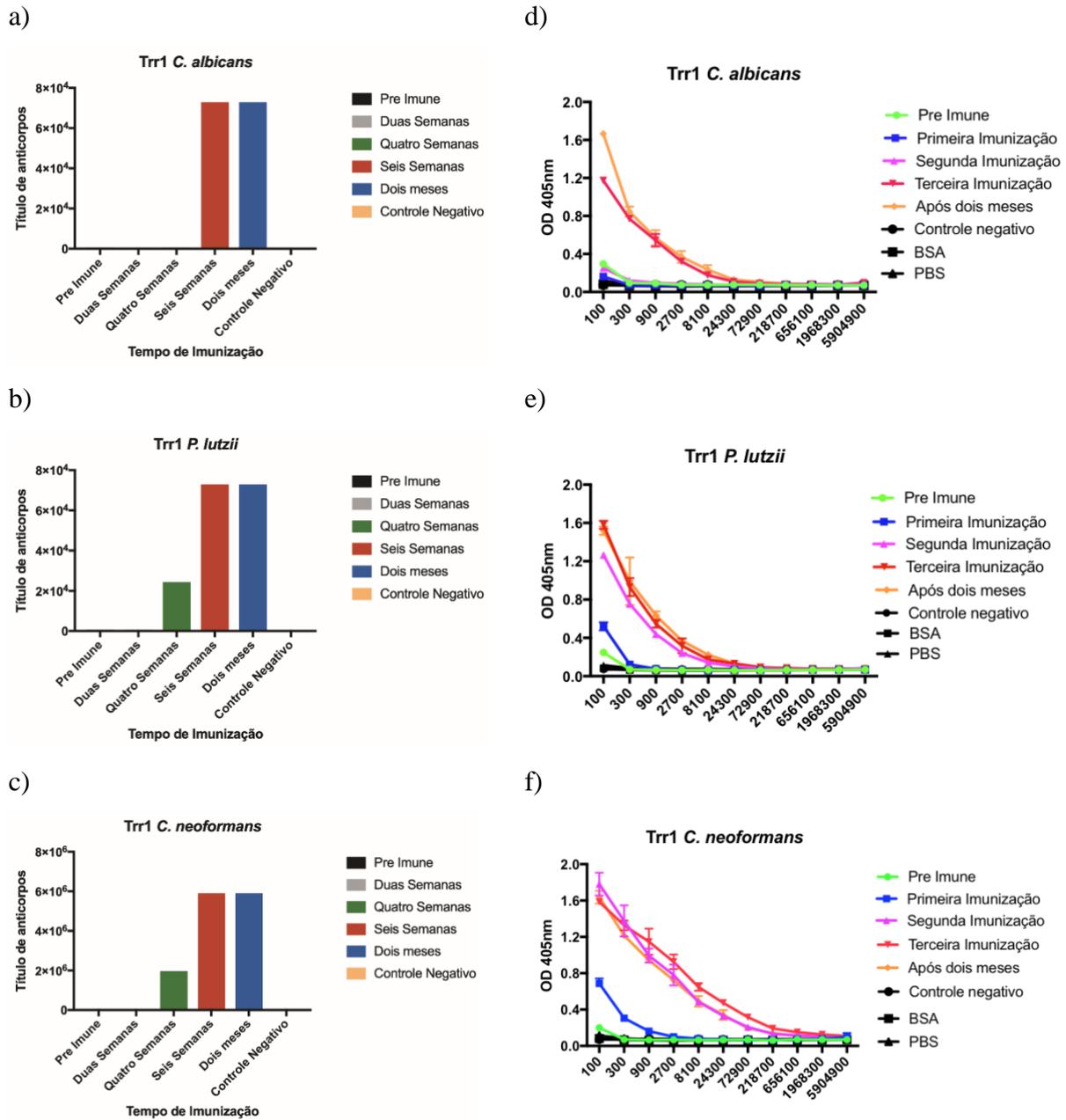
#### 6.4 Imunização dos animais e reação cruzada

A imunização de camundongos BALB/C com as proteínas permitiu a obtenção de anticorpos policlonais a partir do soro desses animais. Foram realizadas três imunizações, a primeira com adjuvante *Freund* completo e as outras duas com adjuvante *Freund* incompleto a cada duas semanas. Foram utilizados três camundongos para cada uma das proteínas e outros três para uma a imunização combinada de Trr1 de cada uma das espécies fúngicas, sendo a primeira imunização com a proteína de *C. albicans*, a segunda de *P. lutzii* e a terceira de *C. neoformans*. A cada imunização foi obtido no máximo 30 µL de sangue do animal pelo seio retro-orbital com

auxílio analgesia. Todos os soros obtidos dos animais imunizados foram analisados por ELISA contra todas as proteínas a fim de observar a capacidade de ligação dos anticorpos gerados pela imunização com as Trr1 de outras espécies e avaliar os títulos obtidos (**Tabela 8**). A proteína demonstrou ser bastante imunogênica apresentando títulos no mínimo  $10^4$  vezes maiores que o controle negativo da placa de ELISA contra todas as proteínas, que permaneceram elevados até os animais serem sacrificados quatro a oito semanas após a última imunização. Camundongos imunizados apenas com Trr1 de *C. neoformans* foram capazes de gerar títulos maiores que  $10^6$  quando analisados com a proteína da mesma espécie (**Figura 19**) A ligação desses anticorpos com a Trr1 de *P. lutzii* e de *C. albicans* demonstrou títulos de  $10^4$ , dessa forma foi possível observar a reação cruzada da proteína com outras espécies. A imunização apenas com Trr1 de *C. albicans* (**Figura 20**) apresentou mesma capacidade imunogênica das proteínas de *C. neoformans*, que quando analisadas se ligando a elas mesmas apresentaram títulos maiores que  $10^6$ , porém demonstrou ser um pouco menos imunogênica quando se refere a ligação cruzada com proteínas de *C. neoformans*, apresentando os menores títulos encontrados, de  $10^4$ . Quando analisada a resposta cruzada dos fungos imunizados com apenas Trr1 de *P. lutzii*, o resultado foi semelhante ao encontrado com Trr1 de *C. albicans* com títulos de  $10^6$  quando analisada com ela própria,  $10^5$  com Trr1 de *C. albicans* e de  $10^4$  com *C. neoformans* (**Figura 21**). Esses resultados corroboram com o alinhamento dos resíduos de aminoácidos de Trr1 dos fungos que demonstram similaridade alta entre as proteínas, o que justifica a possibilidade de apresentarem epítomos iguais. A imunogenicidade da proteína Trr1 foi observada utilizando as proteínas de todas as espécies, assim como a ligação cruzada dos anticorpos, destacando-se para os títulos dos soros de camundongos imunizados com a mesma proteína testada na ligação em placa de ELISA que demonstraram ser ainda mais altos do que nas imunizações apenas com uma única proteína (**Figura 22**).

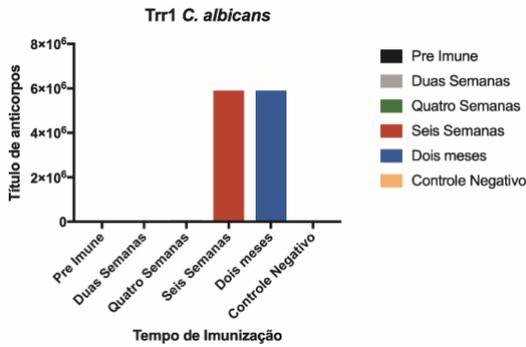
**Tabela 9: Títulos de anticorpos obtidos contra as proteínas Trr1 dos fungos após imunização**

PROTEÍNA IMUNIZADA	PROTEÍNA UTILIZADA NO ELISA		
	<i>C. neoformans</i>	<i>P. lutzii</i>	<i>C. albicans</i>
<i>C. neoformans</i>	$>5,9 \times 10^6$	$7,2 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4$
<i>C. albicans</i>	$8,1 \times 10^3$	$6,5 \times 10^5$	$>5,9 \times 10^6$
<i>P. lutzii</i>	$2,4 \times 10^4$	$>5,9 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$
Combinação das Trr1	$>5,9 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$>5,9 \times 10^6$

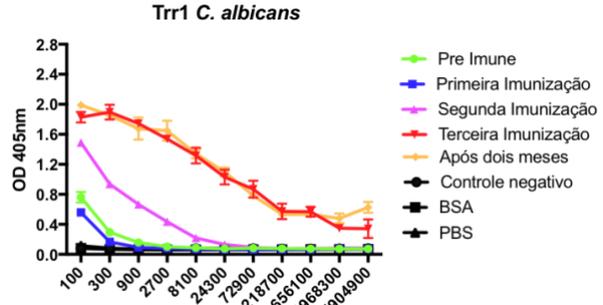


**Figura 19: Camundongos imunizados apenas com Trr1 de *C. neoformans*.** Anticorpos gerados em camundongos imunizados apenas com a proteína de Trr1 de *C. neoformans* são capazes de se ligar às proteínas Trr1 de outros fungos apresentando títulos bastante elevados a partir da segunda imunização demonstrando alta imunogenicidade da proteína. Essa imunização gerou uma resposta de anticorpos com títulos de 10<sup>6</sup> para *C. neoformans* e *C. albicans*, e 10<sup>5</sup> para *P. lutzii*. Figuras A, B e C são os títulos de anticorpos calculados em cada tempo de imunização e as D, E e F são as ODs obtidas para cada diluição do soro do camundongo em cada tempo de imunização.

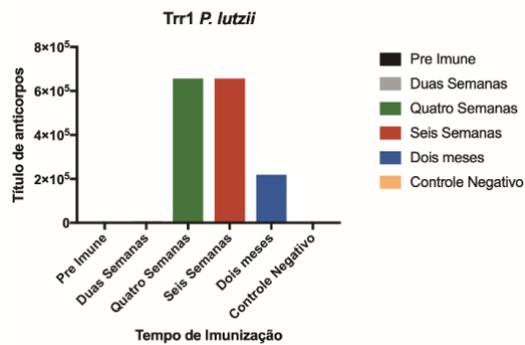
a)



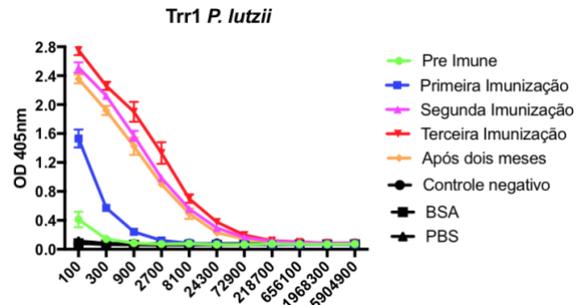
d)



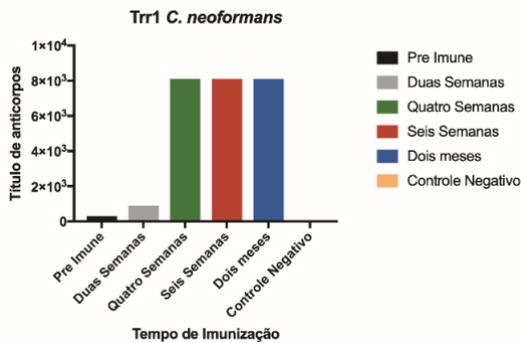
b)



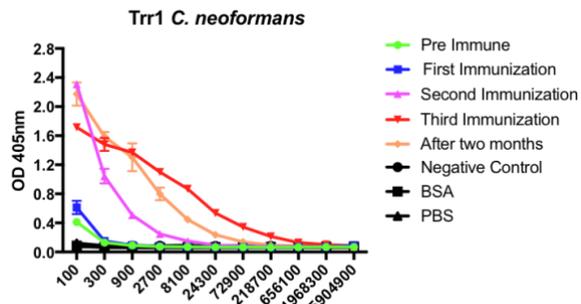
e)



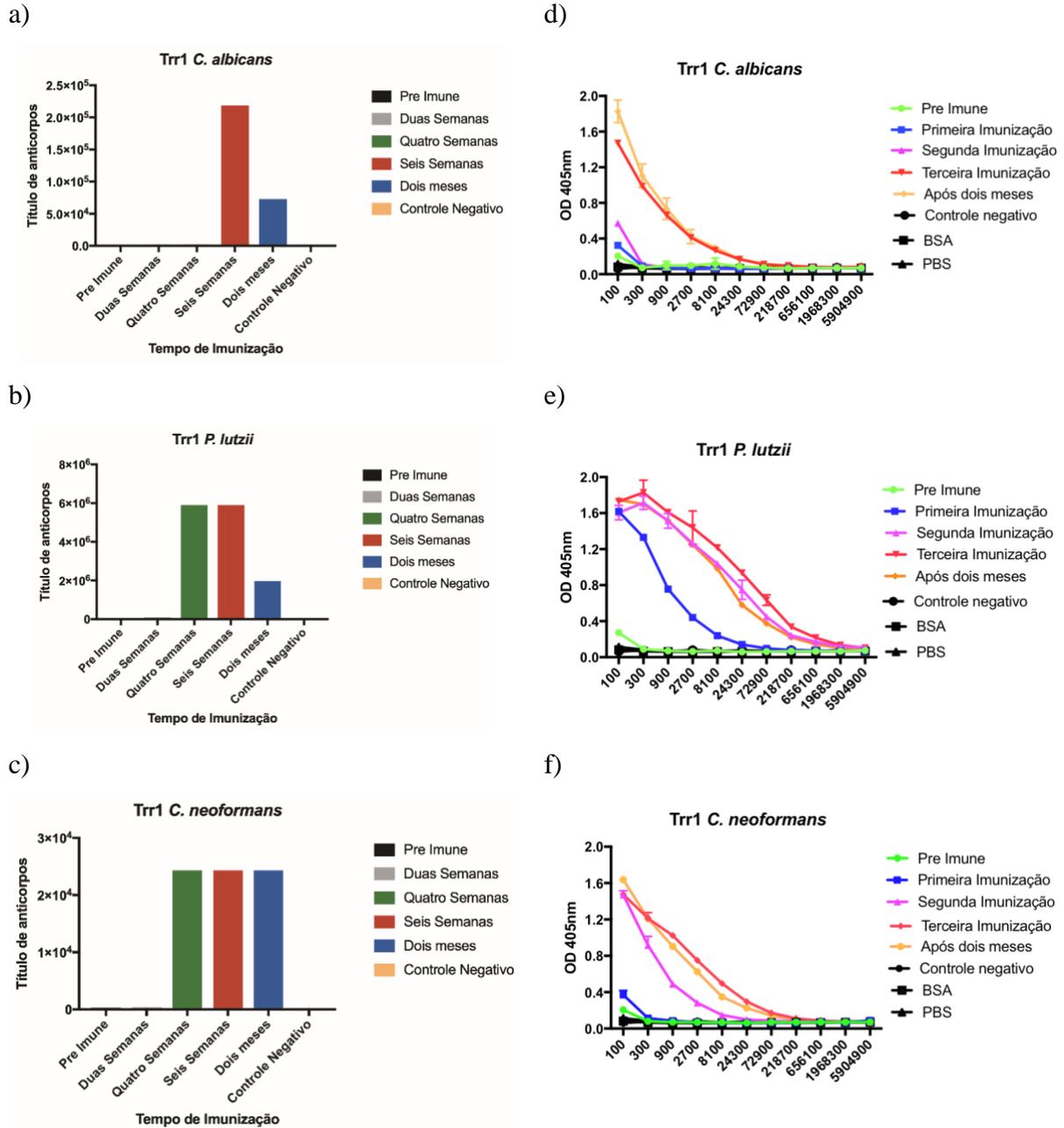
c)



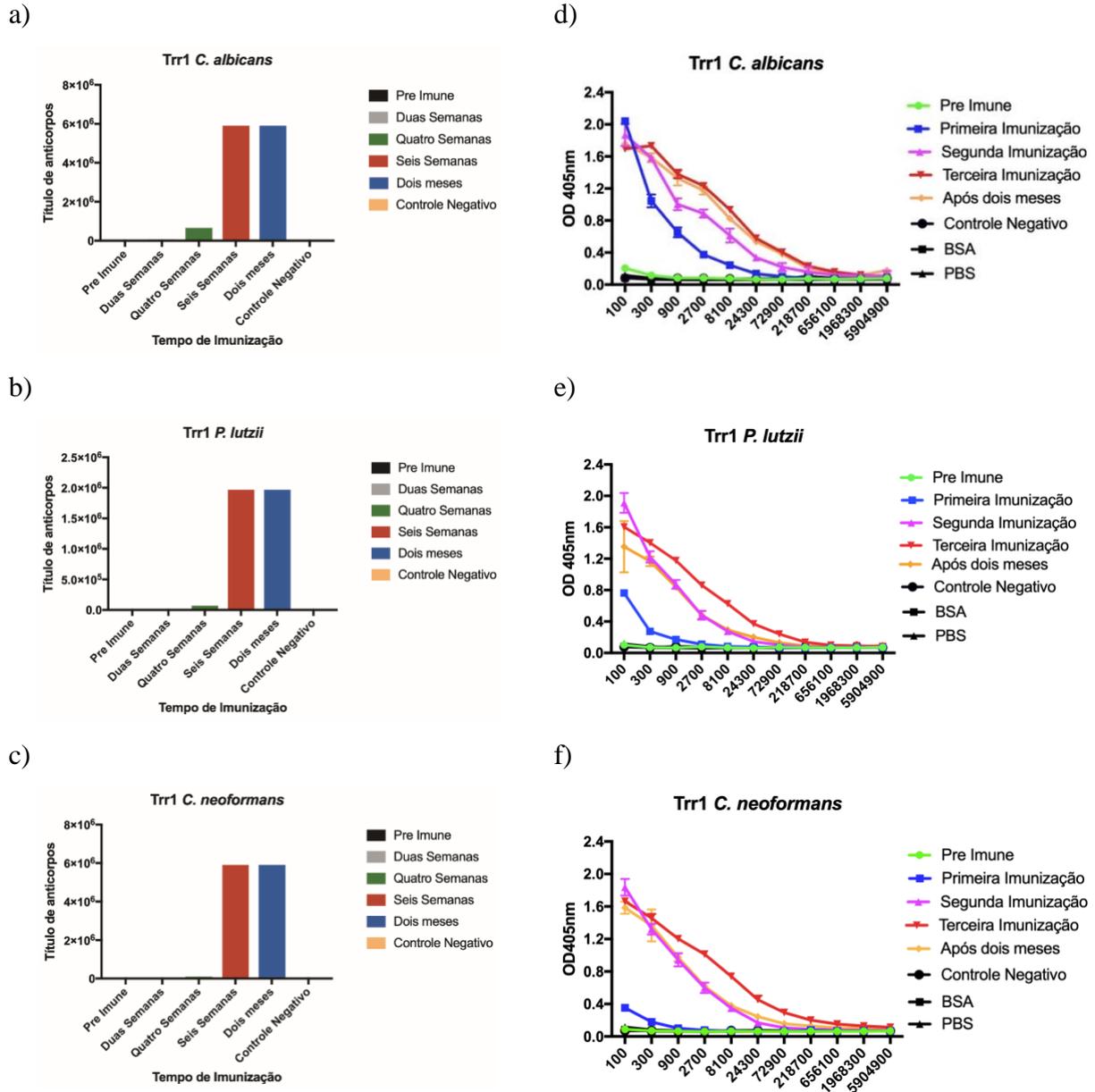
f)



**Figura 20: Camundongos imunizados apenas com Trr1 de *C. albicans*.** Anticorpos gerados em camundongos imunizados apenas com a proteína de Trr1 de *C. albicans* são capazes de se ligar às proteínas Trr1 de outros fungos apresentando títulos elevados contra todas as proteínas a partir da segunda imunização. Observa-se a alta imunogenicidade da proteína, principalmente quando os anticorpos obtidos são analisados contra as mesmas proteínas que resultaram na resposta de títulos mais de um milhão de vezes maior que comparados ao soro pré imune e a primeira imunização. Figuras A, B e C são os títulos de anticorpos calculados em cada tempo de imunização e as D, E e F são as ODs obtidas para cada diluição do soro do camundongo em cada tempo de imunização.



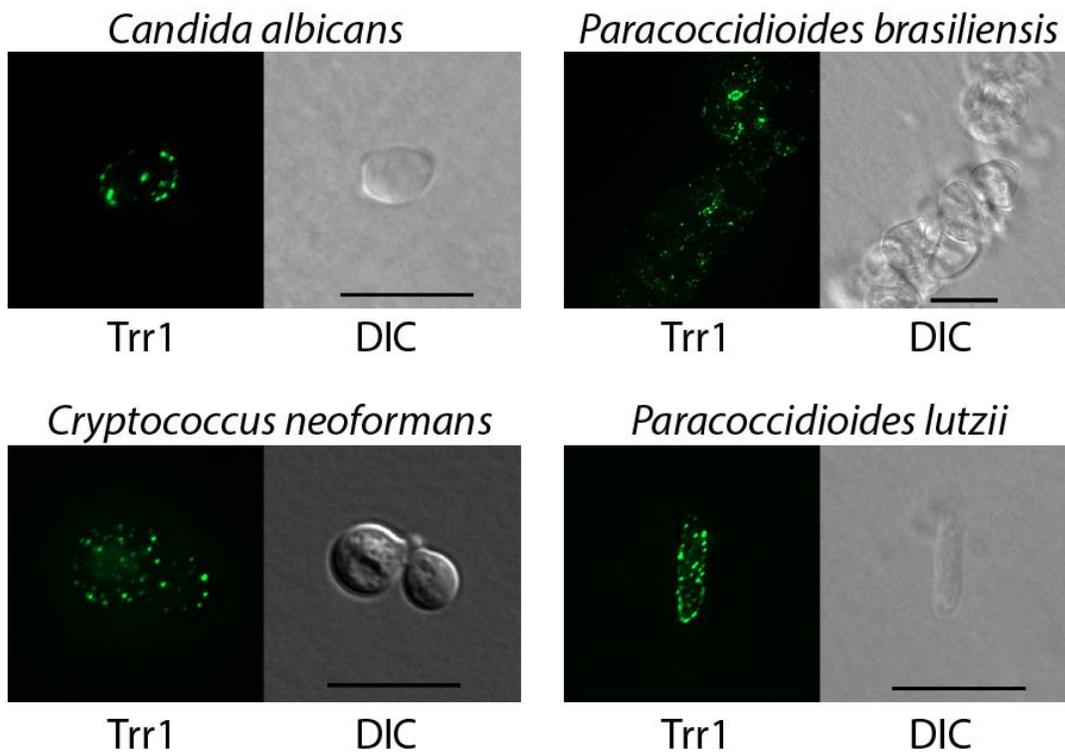
**Figura 21: Camundongos imunizados apenas com Trr1 de *P. lutzii*.** Anticorpos gerados em camundongos imunizados apenas com a proteína de Trr1 de *P. lutzii* resultaram em uma intensa resposta imunológica que levou à produção de elevados títulos de anticorpos contra Trr1 dos três patógenos analisados, *C. albicans*, *P. lutzii* e *C. neoformans*, apresentando os maiores títulos, de mais de 10<sup>6</sup> contra a proteína que desencadeou a reação imunológica. Figuras A, B e C são os títulos de anticorpos calculados em cada tempo de imunização e as D, E e F são as ODs obtidas para cada diluição do soro do camundongo em cada tempo de imunização.



**Figura 22: Camundongos imunizados com a Trr1 de todos os três fungos.** Anticorpos gerados em camundongos imunizados com a proteína de Trr1 de *C. albicans*, *P. lutzii* e *C. neoformans*, respectivamente, resultaram em uma intensa resposta imunológica que levou à produção de elevados títulos superiores a 10<sup>6</sup> de anticorpos contra Trr1 dos três patógenos analisados demonstrando a imunização cruzada. Figuras A, B e C são os títulos de anticorpos calculados em cada tempo de imunização e as D, E e F são as ODs obtidas para cada diluição do soro do camundongo em cada tempo de imunização.

### 6.5 Imunocitocalização utilizando soros policlonais

O soro policlonal obtido foi utilizado para realizar testes de imunofluorescência (**Figura 23**). As células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS, lavadas e então foi adicionado em um tubo o soro pré-imune e em outro o soro da terceira imunização diluídos 1:100. Após serem incubadas por cerca de 1h, foi adicionado o anticorpo secundário Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (*ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos*) diluído 1:100. Foram utilizados 10 µL em uma lâmina. A imunofluorescência foi realizada no microscópio *Zeiss AxioObserver Z1* usando uma objetiva 63x e NA 1.4 e as imagens capturadas com câmera *AxioCam MRm* e software *AxioVision*.

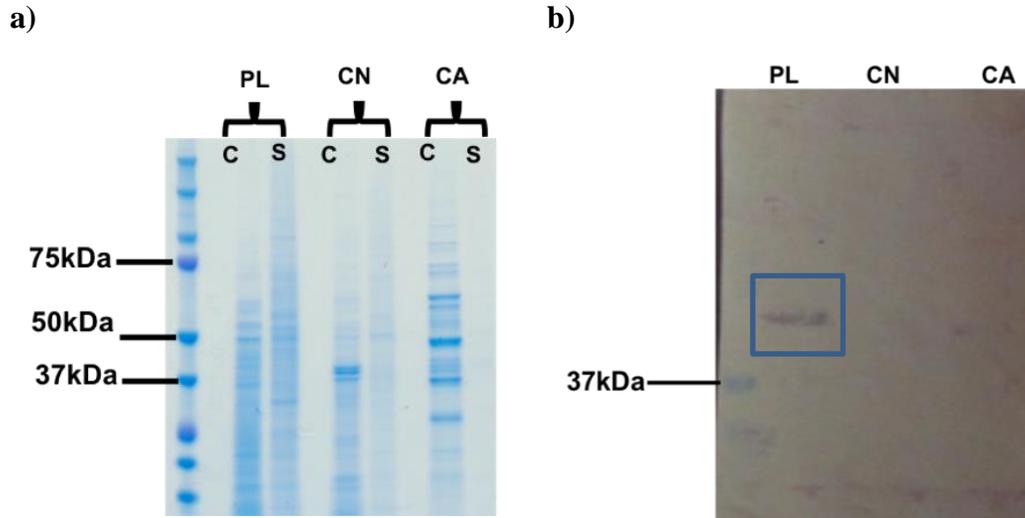


**Figura 23: Imunocitocalização de Trr1 em leveduras de *C. albicans*, *C. neoformans*, *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.** Leveduras de quatro espécies fúngicas diferentes foram incubadas com soro de camundongos imunizados com Trr1 recombinante. A imunização foi feita em três etapas diferentes, cada uma feita com a Trr1 recombinante de uma espécie diferente (*C. albicans*, *C. neoformans*, *P. brasiliensis* e *P. lutzii*). Após a incubação com soro, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 488 para coleção de imagens por epifluorescência seguida de deconvolução (Trr1 - à esquerda nos painéis) ou contraste por interferência diferencial (DIC - à direita nos painéis). As barras de escala correspondem a 10 micrômetros.

Os resultados de imunocitocalização com os anticorpos policlonais obtidos a partir da imunização de camundongos demonstraram que esses anticorpos se ligam às proteínas do fungo. A localização na superfície celular contradiz os estudos que relatam a Trr1 como uma proteína citosólica já que em nossos resultados com os soros policlonais demonstraram a localização na superfície celular em todos os fungos analisados, *C. albicans*, *P. brasiliensis*, *P. lutzii* e *C. neoformans* (Kumar *et al.*, 2011). O experimento de imunocitocalização gerou resultados que permitem acreditar que a produção de anticorpos monoclonais contra as proteínas alvo do estudo de fato atuariam contra os fungos em estudo, já que eles seriam capazes de se ligar a essas proteínas na superfície dos patógenos.

### **6.6 Confirmação da ligação dos anticorpos por *Western Blot***

O *Western Blot* foi realizado a fim de confirmar se os anticorpos policlonais produzidos são capazes de se ligar às proteínas Trr1 obtidas dos fungos por meio de obtenção dos extratos da superfície da célula e do citosol, além de verificar se não são capazes de se ligar a proteínas de camundongos e humanos, evitando interação com as células dos hospedeiros. É importante ressaltar que a quantidade de proteínas Trr1 em cada espécie pode variar, portanto observou-se que iniciando o processo de extração com a mesma contagem de fungos, resultou em quantidades totais de proteínas bastante distintas (**Figura 23**). O resultado demonstrou que os anticorpos se ligaram aos extratos proteicos da superfície de *P. lutzii* e não se ligaram às proteínas de mamíferos do citosol.



**Figura 24: Análise do extrato proteico do citosol (C) e superfície celular (S) dos fungos.** A) Gel de poliacrilamida mostra as diferentes quantidades de proteínas obtidas nos extratos a partir da mesma quantidade de células de cada um dos fungos, o que demonstra a necessidade de padronização para o experimento de *Western Blot* B) *Western Blot* apenas dos extratos de superfície celular sem padronização da quantidade de proteínas a colocar no gel demonstrou que os anticorpos policlonais produzidos se ligaram ao extrato de *P. lutzii*.

### 6.7 Geração de Anticorpos Monoclonais

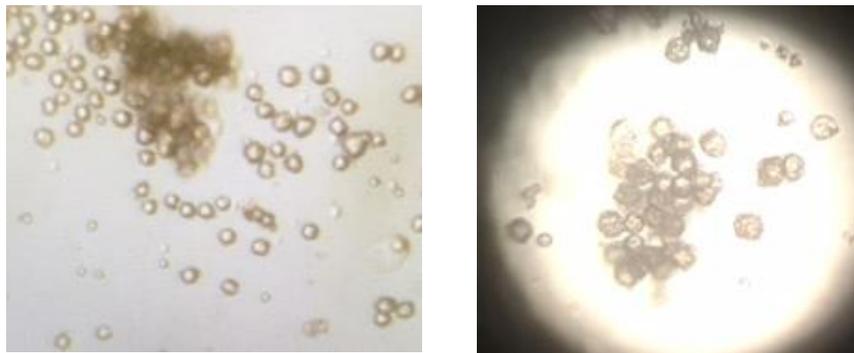
Os anticorpos monoclonais foram gerados através da fusão de linfócitos obtidos dos camundongos imunizados com células de mieloma Sp2/O ou NSO e permaneceram crescendo em meio RPMI a 37°C. As duas fusões geraram cinco placas de 96 poços, porém ao longo do tempo vários poços sofreram contaminação por fungos por se tratar de um meio bastante suplementado e dessa forma, mais suscetível a contaminações. Os poços contaminados no geral eram isolados retirando o conteúdo e lavando com etanol o que evita a propagação da contaminação.

A **primeira fusão** utilizando Sp2/O resultou em 132 poços inicialmente para serem analisados por ELISA, já que os demais sofreram contaminação. As células foram sendo expandidas de placas de 96 a placas de 24 poços e foi retirada a suplementação de Hipoxantina Timina (HT) utilizado na seleção dos hibridomas que são as células que sobrevivem na presença desses compostos.

A seleção inicial dos clones positivos foi realizada utilizando uma mistura das proteínas Trr1 de *P. lutzii*, *C. albicans* e *C. neoformans* resultando em apenas dez hibridomas positivos capazes de se ligar a pelo menos uma das proteínas, que foram nomeados, expandidos e armazenados a -80°C.: 3A2, 3A12, 3B1, 3C1, 3D5, 3E2, 3E5, 3F5, 3G3, 3H6. Dois clones

demonstraram anticorpos monoclonais potenciais pelos sinais positivos obtidos por ELISA, sendo 3C1, que obteve alta capacidade de se ligar à proteína Trr1 de *C. albicans* e fraca à de *P. lutzii* e, 3F5 alta apenas a Trr1 de *C. albicans* tendo capacidade de expansão rápida. Os clones 3A2 e 3H6, junto aos já mencionados demonstraram ser capazes de gerar clones viáveis e para todos esses foi realizada a diluição limitante, resultando na obtenção dos anticorpos monoclonais, que foram expandidos e armazenados à temperatura de -80°C. Os demais clones 3A12, 3E5, 3D1, 3G3 foram expandidos e armazenados, porém demonstraram crescimento mais lento.

A **segunda fusão** foi realizada utilizando células NSO resultando inicialmente em cinco placas de 96 poços que deram origem a 227 clones positivos para pelo menos uma das três Trr1 entre os fungos *P. lutzii*, *C. albicans* e *C. neoformans*. Entre todos os clones positivos, foi identificado que 9 eram positivos para todas as proteínas. No entanto essa segunda fusão apesar de resultar em sinais no ELISA utilizando o sobrenadante da cultura, não resultou em células viáveis, que cresceram em poços de 96 rapidamente e iniciaram um processo de morte celular rapidamente impedindo sua expansão clonal e sua caracterização (**Figura 25**).



**Figura 25: Expansão clonal pode ocasionar clones não viáveis.** A fusão de mielomas com linfócitos geram hibridomas que inicialmente são bastante instáveis e podem sofrer mutações eliminando genótipos e a capacidade de sobreviver no meio usado, provocando sua morte. Células não viáveis tendem a formar aglomerados de células no centro do poço da placa e deixam de ser translúcidas tornando-se cada vez mais rugosas até sofrerem apoptose e deixarem seus debris celulares no meio.

A medida que o número de células em cultura aumentava e eram repicadas para novas placas, elas se mostravam instáveis e iniciavam um processo de morte celular que era observado com o escurecimento do citoplasma celular, aumento da rugosidade e aglomeração de células no meio no centro da placa. Os hibridomas não são células totalmente aderentes, porém permanecem

parcialmente no fundo de toda a área de placa e, quando iniciavam o processo de perda de viabilidade os aglomerados passavam a flutuar no meio. Ao longo do processo os clones não foram sobrevivendo a cada tentativa de repique e expansão clonal inclusive para que fossem preparados estoques de armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Dessa forma, essa segunda fusão não foi bem-sucedida e não resultou em hibridomas viáveis para produção de anticorpos monoclonais para análise seguinte de ligação ao alvo-molecular Trr1.

## 7. DISCUSSÃO

A imunoterapia tem se mostrado promissora e alvo de muitos estudos para o desenvolvimento de novas tecnologias no tratamento de doenças, evitando acentuados efeitos adversos no organismo dos pacientes, que muitas vezes já se encontram em um quadro clínico mais debilitado. Um aspecto importante acerca de novas terapias contra doenças infecciosas é a compreensão da interação patógeno-hospedeiro e da patogênese do microrganismo, que muitas vezes apresentam questões a serem solucionadas, como o estabelecimento e desenvolvimento da doença. Isso torna insuficiente prever quais antígenos e anticorpos podem ser alvos de terapia (Saylor *et al.*, 2009).

A estratégia de utilização de imunoterapias universais para determinados grupos de patógenos, tornou-se mais viável a partir de dados obtidos em estudos genéticos de microrganismos, como o sequenciamento, DNA recombinante, filogenia e genômica comparativa, que forneceram informações de antígenos conservados ou não em diferentes espécies (Cassone e Rappuoli, 2010). Baseado em estudos como estes, foi identificado o alvo da tiorredoxina redutase como potencial proteína-alvo para sua utilização na terapêutica de doenças fúngicas em humanos (Abadio *et al.*, 2011).

Nosso grupo de pesquisa já trabalha há muitos anos na busca de novas terapias antifúngicas, desde a compreensão de mecanismos moleculares do patógeno, passando por sua interação com o hospedeiro, até busca por novos alvos moleculares para fármacos que possam ser eficazes contra infecções de relevância clínica chegando ao desenvolvimento de compostos com propriedades antifúngicas. A tiorredoxina redutase foi um dos alvos escolhidos para ser amplamente estudado devido a sua importância na sobrevivência dos fungos, sendo um gene essencial para muitos patógenos. Esta proteína participa da manutenção da homeostase celular minimizando o estresse oxidativo interno.

O complexo tiorredoxina, composto por duas enzimas que atuam no equilíbrio redox das células dos organismos, é encontrado em todos os seres vivos, porém apresentam divergências muito grandes entre os reinos dos seres vivos (Holmgren, 1985). Estudos de genômica comparativa observaram que entre os fungos a proteína tiorredoxina redutase Trr1 encontra-se conservada e poderia ser utilizada como um alvo para fármacos antifúngicos (Abadio *et al.*, 2011). A proteína Trr1 de *C. neoformans* foi identificada pela ferramenta BLAST, no qual observou-se baixa massa

molecular semelhante a Trr1 de *S. cerevisiae*. Essa mesma ferramenta permitiu a identificação das sequências de Trr1 de *C. albicans*, *P. lutzii* e *A. fumigatus*, que foram alinhadas e se mostraram com alta similaridade. Baseado no sequenciamento do cDNA de Trr1 de *C. neoformans*, foi observado a presença de sete éxons e a proteína contendo 343 aminoácidos (Missall e Lodge, 2005). Nesse mesmo fungo, a deleção desse gene, demonstrou ser essencial para sua sobrevivência, podendo ser um alvo eficaz para o desenvolvimento de fármacos antifúngicos (Ianiri e Idnurm, 2015). Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de doutorado da Cláudia Bravo, no qual foi realizado o silenciamento do promotor desse gene resultando em consequências para a estabilidade da célula. Embora a tiorredoxina redutase seja encontrada tanto em fungos, como em humanos, suas estruturas e seu mecanismo de ação são diferentes, evitando que ocorra interação nos mecanismos que cada uma das enzimas dos organismos desempenha (Zhong *et al.*, 2000).

A relevância da participação da proteína Trr1 na sobrevivência das células, eliminando espécies oxidativas de oxigênio e evitando o consequente mecanismo de apoptose, além de sua participação indireta em outras vias importantes de manutenção da homeostase da célula, resultaram em um interesse pelo aprofundamento de informações sobre esse alvo. Em *E. coli*, foi observado que a tiorredoxina se localiza em frações de membrana após a lise celular, que corroboram com os achados de microscopia que observaram a proteína próxima a membrana celular, o que mostra que sua localização possivelmente está relacionada a de adesão de células (Holmgren, 1985).

A análise do proteoma de *P. brasiliensis* identificou a tiorredoxina redutase como proteína de parede relacionada a forma leveduriforme do fungo (Longo *et al.*, 2013). Esse resultado reforça os achados deste trabalho que mostrou sua localização celular na superfície celular nos quatro fungos patogênicos *C. neoformans*, *C. albicans*, *P. lutzii* e *P. brasiliensis*. Dessa forma, se as proteínas envolvidas no mecanismo redox estiverem relacionadas a adesão das células, um anticorpo que interage com este alvo poderia dificultar esse processo, prejudicando a manutenção da infecção.

A análise de similaridade de Trr1 entre fungos patogênicos *C. albicans*, *C. neoformans*, *P. lutzii* e ainda *A. fumigatus* demonstrou que é uma proteína conservada apresentando mais de 66% de similaridade. Por ser completamente diferente da proteína humana é um alvo potencial para fármacos antifúngicos que além de ter possibilidade de amplo espectro atuando em vários

patógenos, é específico para o alvo e potencialmente apresenta riscos reduzidos de efeitos adversos no hospedeiro. Resultados preliminares em nosso grupo identificaram moléculas com capacidade de reduzir a carga fúngica de *Paracoccidioides sp.* Nesse trabalho foi realizado o primeiro estudo relacionado a propriedade imunológica desta proteína. Foi observado que as proteínas dos três fungos patogênicos, *C. albicans*, *C. neoformans* e *P. lutzii*, são altamente imunogênicas e capazes de gerar títulos de anticorpos superiores àqueles obtidos em imunizações com outros antígenos. Estes anticorpos são também capazes de interagir com as três proteínas simultaneamente, o que é vantajoso para o uso desta proteína para produção de anticorpos universais.

Anticorpos obtidos nesse estudo demonstraram ser capazes de se ligar às proteínas Trr1 dos fungos testados podendo inclusive interagir concomitantemente com as quatro diferentes Trr1. Potencialmente, uma imunoterapia utilizando a esse alvo poderia ser eficaz contra os diversos fungos patogênicos testados neste trabalho. Isto envolve a utilização de anticorpos contra antígenos fúngicos universais mediando uma proteção cruzada, o que demonstra ser uma terapia vantajosa e econômica apresentando efetividade independente da identificação do patógeno, o que contribui para falha terapêutica e ocorrência de efeitos adversos (Casadevall e Pirofski, 2007). Isso foi observado com anticorpos monoclonais que mimetizam uma toxina contra *C. albicans* e *A. fumigatus*, além de mAbs contra  $\beta$  glucana, como o mAb 2G8, que conferiram respostas protetoras contra os mesmos dois fungos e também *C. neoformans* (Polonelli *et al.*, 1997; Rachini *et al.*, 2007; Steele *et al.*, 2013).

Soros policlonais de camundongos imunizados com virossoma de Sap2 também mostraram reação cruzada com outras proteínas desse grupo, Sap1 e Sap3, que participam durante a vaginite por *Candida*, o que resulta em uma ação dos anticorpos contra três proteínas que participam do processo de infecção e não apenas uma (De Bernardis *et al.*, 2012). A obtenção desses anticorpos universais é um conceito relativamente novo e que ainda não foi amplamente estudado, mas já demonstrou resultados inesperados devido aos alvos serem conservados em fungos de diferentes espécies e filogeneticamente distantes, como ascomicetos e basidiomicetos que se divergiram há mais de 1 bilhão de anos (Casadevall e Pirofski, 2007), como no caso deste trabalho.

A imunização utilizando apenas a proteína de uma única espécie ou utilizando proteínas de todas as espécies resultou em uma resposta imune produtora de anticorpos com epítomos que podem ser comuns a todas elas e outros que podem ser específicos para cada uma, já que também as sequências apresentam regiões com divergências. Os anticorpos policlonais, após

permeabilização das células fúngicas, mostraram que a Trr1 se localiza na superfície celular, o que potencialmente facilitaria a ligação deste anticorpo à proteína-alvo. Esses resultados demonstram que a proteína Trr1 é promissora como um alvo para a imunoterapia de infecções fúngica pela utilização de anticorpos monoclonais com largo espectro evitando a necessidade de identificação imediata do patógeno para o tratamento inicial da doença.

Espera-se que esse trabalho seja base para a obtenção de anticorpos que se liguem às proteínas alvo e que estes sejam capazes de reduzir infecções antifúngicas. Há uma necessidade premente de se desenvolver novas terapias antifúngicas. Anticorpos contra as proteínas Trr1 apresentam um potencial de serem eficientes no tratamento dessas infecções por serem genes importantes para a sobrevivência dos patógenos e terem fácil localização para os anticorpos agirem.

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais pode ser realizado por diferentes tecnologias sendo cada uma delas vantajosa e limitante em diferentes aspectos. A imunização em camundongos para a fusão com mieloma e a geração de anticorpos monoclonais a partir de hibridomas é vantajosa uma vez que gera anticorpos com estrutura completa a partir de animais manipulados apenas em laboratório sem nunca terem sido expostos aos patógenos de estudo, *C. albicans*, *C. neoformans* e *P. lutzii*, o que garante uma maior especificidade às respostas de imunização (Edwards, 2012). Além disso, esses anticorpos por serem gerados contra o próprio alvo dentro de um organismo possuem maior chance de serem eficazes e não serem eliminados por um organismo por mecanismos de autoimunidade. No caso da estratégia de obtenção de anticorpos por *Phage display*, esta permite gerar o anticorpo completo bem como fragmentos de anticorpos constituídos pelas regiões Fab ou Fc. Estudos demonstraram que para cada tipo de interação é necessário a presença de fragmentos diferentes, no caso daqueles de *C. albicans* e *C. neoformans* contra glicoruxilomanana é necessário a região Fc, porém para respostas contra manoproteínas e HSP90 de *C. albicans*, o fragmento Fab que deveria estar presente. A utilização da estrutura completa do anticorpo é uma estratégia racional para o desenvolvimento de anticorpos universais, atuando em vários patógenos (Casadevall e Pirofski, 2007).

O estudo da imunologia é bastante dinâmico e tem avançado ao longo dos anos, mas muitas vezes seu conhecimento ainda é insuficiente para determinar quais anticorpos são efetivos para um microrganismo específico, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos. Cada anticorpo é específico para um epítipo diferente, portanto irá desencadear uma resposta diferente, sendo

alguns efetivos e outros não (Casadevall *et al.*, 2004). A especificidade de mAbs é uma vantagem que também pode tornar-se uma desvantagem em relação ao seu uso contra microrganismos dependendo da taxa de mutação destes, já que um único anticorpo não poderia não ser eficaz e haveria a necessidade de utilizar uma combinação de anticorpos monoclonais para uma eficiente terapia (Saylor *et al.*, 2009). Recentemente foi publicado um estudo de fase 2 randomizado de uma vacina de uma porção N- terminal de proteína de *C. albicans* que participa na aderência e invasão tecidual apresentando alta imunogenicidade e redução dos sintomas em pacientes com candidíase vulvovaginal recorrente comparados a um grupo placebo (Edwards *et al.*, 2018).

Entre as dificuldades de utilização de anticorpos destaca-se a fragilidade das moléculas que requerem cuidados específicos de manipulação, como o armazenamento adequado em local refrigerado. Outra dificuldade no uso de anticorpos é estimar a quantidade ideal de uso para os pacientes, pois organismos diferentes respondem de forma diferente a terapia. Nesse contexto é necessário levar em consideração que pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes provavelmente irão responder e necessitar de doses diferenciadas de anticorpos, que deve ser uma quantidade de anticorpos que não seja baixa o suficiente a fim de evitar a resposta terapêutica, nem alta o suficiente para ocasionar um efeito prozona (Casadevall *et al.*, 2004). A utilização de anticorpos universais pode atrapalhar a resposta imunológica dificultando a eliminação do patógeno, ou então resultar em uma resposta fraca por não possuir sequências imunodominantes, necessitando uma conjugação com antígenos imunogênicos ou uso de adjuvantes a fim de estimular a resposta imune (Cassone e Rappuoli, 2010).

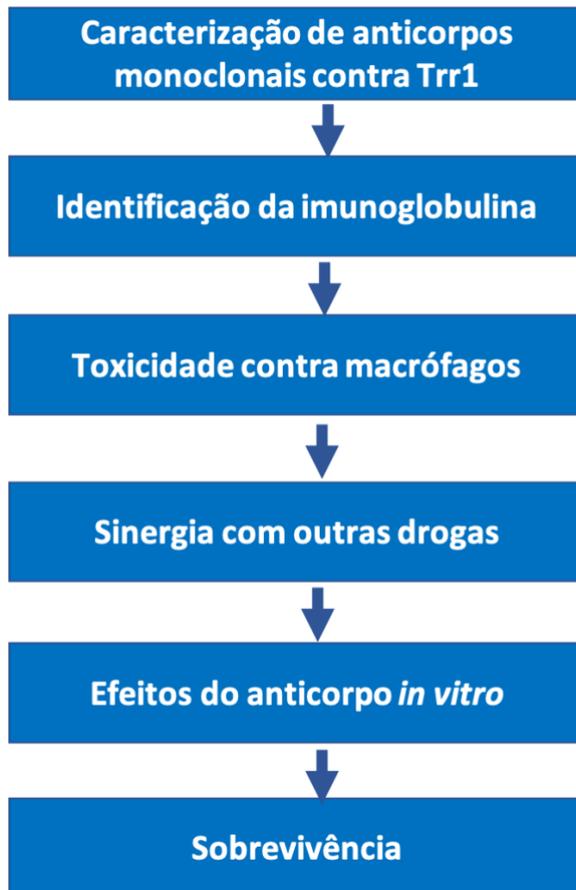
A descoberta de novos anticorpos protetores em diferentes alvos contribui para o avanço na abordagem terapêutica em doenças fúngicas possibilitando o uso combinado com outros fármacos. Apesar de algumas controvérsias em seu uso, a imunoterapia com anticorpos monoclonais deve ser considerada por contribuir na modulação da resposta imune do paciente, além de reduzir efeitos adversos devido a uma ação sistêmica em diversos órgãos e permitir a redução de doses de fármacos mais tóxicas ao organismo quando utilizados de forma combinada. A abordagem imunoterapêutica pode ser um tratamento mais eficaz e com maior perfil de segurança em um paciente com condições de saúde bastante delicadas em que a escolha da abordagem clínica influencia diretamente o prognóstico da doença.

## 8. CONCLUSÃO

Esse trabalho mostrou a obtenção de grande quantidade de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* de três tipos de fungos patogênicos humanos *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e *Paracoccidioides lutzii*. As condições de indução da produção das proteínas foram otimizadas a fim de melhorar o rendimento utilizando menos meio para crescimento da bactéria e menos indutor. Essas proteínas foram capazes de desencadear resposta imune em camundongos gerando títulos de anticorpos mais de um milhão de vezes superiores ao controle, o que considerado elevado de acordo com àqueles encontrados em imunizações na literatura. Além da alta imunogenicidade, a similaridade observada na análise das sequências de proteínas permite que a resposta imunológica gerada para cada uma das proteínas resulte em resposta cruzada, pela presença de epítomos comuns entre as três proteínas. Dessa forma, todas as imunizações realizadas, apenas com uma proteína, ou com combinação delas, foram capazes de gerar anticorpos capazes de se ligar a todas as três Trr1 com maior ou menos afinidade. Por fim, foi observado que o anticorpo policlonal é capaz de se ligar diretamente à proteína no fungo, que se localiza em sua superfície, permitindo que o anticorpo atue tanto por inibição direta no alvo quanto por outros mecanismos de ação como a clássica fagocitose, porém o mecanismo de ação ainda deverá ser devidamente esclarecido. Os resultados obtidos fornecem informações que a enzima tiorredoxina redutase pode ser um potencial alvo para imunoterapias e deve ser explorado para que os mecanismos sejam esclarecidos e as terapias caracterizadas.

## 9. PERSPECTIVAS

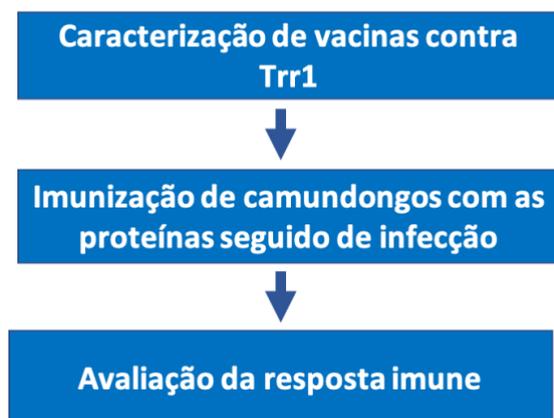
Esse foi o primeiro trabalho que investigou uma potencial ação imunológica de Trr1 de fungos. Células de hibridomas produtoras de anticorpos monoclonais foram geradas a fim de obter anticorpos que possam atuar tanto modulando a resposta imunológica do paciente quanto se ligar ao alvo fúngico controlando assim a infecção. Esses anticorpos devem ser avaliados quanto as suas características a fim de verificar a potencialidade de seu uso como um antifúngico (**Figura 25**). Para isso é necessário a obtenção de células viáveis e quantidades suficientes do anticorpo a fim de avançar no estudo das propriedades físico-químicas e imunológicas dos anticorpos obtidos neste trabalho.



**Figura 25: Esquema de caracterização dos anticorpos monoclonais.** Clones de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais devem ser cultivados em larga escala a fim de obter concentrações para sua caracterização. Esses anticorpos devem primeiramente ser identificados e posteriormente avaliados de acordo com uma série de características, como toxicidade, sinergia com outras drogas, efeitos *in vitro* e *in vivo* dos anticorpos na presença do fungo e sua eficácia em proteger animais infectados.

Inicialmente é necessário verificar se os anticorpos apresentam toxicidade para outras células, por exemplo em macrófagos. A função exata de como o anticorpo poderia modular a resposta, através de uma função clássica como a neutralização ou de uma função mais específica como a ligação ao alvo Trr1 bloqueando sua função enzimática, será possível de ser determinada por testes *in vivo* utilizando camundongos. Testes de concentração mínima inibitória podem estabelecer se os anticorpos são capazes de bloquear a atividade enzimática de Trr1 e se essa inibição altera a viabilidade dos fungos. A força de ligação entre o anticorpo e a proteína pode ser determinada por ressonância plasmônica de superfície (SPR), já que é de interesse um anticorpo que tenha alta afinidade com os antígenos. Posteriormente, também é importante verificar a sinergia do anticorpo monoclonal com outros fármacos antifúngicos como anfotericina B, itraconazol e fluconazol, que são os fármacos de primeira escolha no tratamento das micoses.

Outra linha de pesquisa que pode ser investigada a partir dos resultados obtidos nesse trabalho é a viabilidade de utilizar a proteína Trr1 como uma vacina terapêutica, já que a proteína é essencial para o fungo e demonstrou ser imunogênica em camundongos. No entanto não foi testado se os anticorpos produzidos no organismo são capazes de protegê-lo de uma infecção e para verificar isto é necessário que os camundongos sejam infectados pelos fungos após a imunização e então avaliados quanto a sua sobrevivência bem como a produção de citocinas e ativação de linfócitos desencadeados a partir desse processo (**Figura 26**).



**Figura 26: Esquema para avaliar o uso de Trr1 como potencial vacina terapêutica.** A Trr1 pode ser avaliada como possível vacina terapêutica por ser uma proteína imunogênica e essencial para o fungo. A fim de verificar essa potencialidade é necessário que os animais sejam imunizados previamente e posteriormente infectados com os fungos para verificar a resposta imune desencadeada, se há produção de citocinas e ativação de respostas Th.

## REFERÊNCIAS

ABADIO, A. K. et al. Identification of New Antifungal Compounds Targeting Thioredoxin Reductase of Paracoccidioides Genus. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0142926, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26569405> >.

\_\_\_\_\_. Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. **BMC Genomics**, v. 12, p. 75, 2011. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21272313> >.

ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and Cryptococcus neoformans pathogenesis. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 55-8, May 2015. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25256589> >.

ARNER, E. S.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 20, p. 6102-9, Oct 2000. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11012661> >.

ARNÉR, E. S.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 20, p. 6102-9, Oct 2000. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11012661> >.

BABCOCK, G. J. et al. Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent Clostridium difficile-induced mortality in hamsters. **Infect Immun**, v. 74, n. 11, p. 6339-47, Nov 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16966409> >.

BAGAGLI, E. et al. Paracoccidioides brasiliensis: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, Apr-May 2008. ISSN 0301-486X (Print)

0301-486X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777629> >.

BAKKER, A. B. et al. First administration to humans of a monoclonal antibody cocktail against rabies virus: safety, tolerability, and neutralizing activity. **Vaccine**, v. 26, n. 47, p. 5922-7, Nov 2008. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804136> >.

BAROUCH, D. H. et al. Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. **Nature**, v. 503, n. 7475, p. 224-8, Nov 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24172905> >.

BENJAMIN, E. et al. A broadly neutralizing human monoclonal antibody directed against a novel conserved epitope on the influenza virus H3 hemagglutinin globular head. **J Virol**, v. 88, n. 12, p. 6743-50, Jun 2014. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24696468> >.

BIDAUD, A. L.; CHOWDHARY, A.; DANNAOUI, E. Candida auris: An emerging drug resistant yeast - A mini-review. **J Mycol Med**, Jul 2018. ISSN 1773-0449. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30030072> >.

BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 1177-91, Sep 2013. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24020744> >.

BRAND, S. R. et al. A Phase 2, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Ranging Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Orally-Administered VT-1161 in the Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. **Am J Obstet Gynecol**, Mar 2018. ISSN 1097-6868. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29534874> >.

BROERING, T. J. et al. Identification and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies directed against the E2 envelope glycoprotein of hepatitis C virus. **J Virol**, v. 83, n. 23, p. 12473-82, Dec 2009. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759151> >.

BUISSA-FILHO, R. et al. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. **Infect Immun**, v. 76, n. 7, p. 3321-8, Jul 2008. ISSN 1098-5522 (Electronic)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18458072> >.

BURTON, D. R. et al. Broadly neutralizing antibodies present new prospects to counter highly antigenically diverse viruses. **Science**, v. 337, n. 6091, p. 183-6, Jul 2012. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22798606> >.

BUTLER, G. Fungal sex and pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 1, p. 140-59, Jan 2010. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20065328> >.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochem Pharmacol**, v. 133, p. 86-96, 06 2017. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27884742> >.

CASADEVALL, A.; DADACHOVA, E.; PIROFSKI, L. A. Passive antibody therapy for infectious diseases. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 9, p. 695-703, Sep 2004. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372080> >.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Feasibility and prospects for a vaccine to prevent cryptococcosis. **Med Mycol**, v. 43, n. 8, p. 667-80, Dec 2005. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16422296> >.

\_\_\_\_\_. Antibody-mediated protection through cross-reactivity introduces a fungal heresy into immunological dogma. **Infect Immun**, v. 75, n. 11, p. 5074-8, Nov 2007. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709417> >.

CASSONE, A.; CASADEVALL, A. Recent progress in vaccines against fungal diseases. **Curr Opin Microbiol**, v. 15, n. 4, p. 427-33, Aug 2012. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22564747> >.

CASSONE, A.; RAPPUOLI, R. Universal vaccines: shifting to one for many. **MBio**, v. 1, n. 1, May 2010. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20689748> >.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol Cell Biol**, v. 14, n. 7, p. 4912-9, Jul 1994. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8007987> >.

CHANG, Y. L. et al. New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 222-236, 02 2017. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27820668> >.

CHAYAKULKEEREE, M. et al. Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 69, n. 4, p. 809-26, Aug 2008. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18532984> >.

CHENG, S. C. et al. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. **Infect Immun**, v. 80, n. 4, p. 1304-13, Apr 2012. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22252867> >.

CHIN, V. K. et al. Dissecting *Candida albicans* Infection from the Perspective of *C. albicans* Virulence and Omics Approaches on Host-Pathogen Interaction: A Review. **Int J Mol Sci**, v. 17,

n. 10, Oct 2016. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27763544> >.

CLARK, F. S. et al. Correlation between rhodamine 123 accumulation and azole sensitivity in *Candida* species: possible role for drug efflux in drug resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 2, p. 419-25, Feb 1996. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8834890> >.

COLLET, J. F.; MESSENS, J. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 8, p. 1205-16, Oct 2010. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20136512> >.

CORDERO, R. J. et al. Antibody binding to *Cryptococcus neoformans* impairs budding by altering capsular mechanical properties. **J Immunol**, v. 190, n. 1, p. 317-23, Jan 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233725> >.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 7, p. a019752, Nov 2014. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25384768> >.

COX, G. M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 166-75, Jan 2001. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123698> >.

DE BERNARDIS, F. et al. A virosomal vaccine against candidal vaginitis: immunogenicity, efficacy and safety profile in animal models. **Vaccine**, v. 30, n. 30, p. 4490-8, Jun 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561143> >.

DE OLIVEIRA, R. B. et al. Epidemiology of invasive fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome at a reference hospital for infectious diseases in Brazil. **Mycopathologia**, v. 178, n. 1-2, p. 71-8, Aug 2014. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24952013> >.

DE WIT, K. et al. In vitro profiling of pramiconazole and in vivo evaluation in *Microsporum canis* dermatitis and *Candida albicans* vaginitis laboratory models. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 11, p. 4927-9, Nov 2010. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805398> >.

DEL POETA, M. Special Issue: Novel Antifungal Drug Discovery. **J Fungi (Basel)**, v. 2, n. 4, 12 2016. ISSN 2309-608X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28058254> >.

DEL POETA, M.; CASADEVALL, A. Ten challenges on Cryptococcus and cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 303-10, Jun 2012. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948062> >.

DENNING, D. W.; BROMLEY, M. J. Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1414-6, Mar 2015. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25814567> >.

DJORDJEVIC, J. T. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from cryptococcus neoformans. **Front Microbiol**, v. 1, p. 125, 2010. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21687772> >.

EDWARDS, J. E. Fungal cell wall vaccines: an update. **J Med Microbiol**, v. 61, n. Pt 7, p. 895-903, Jul 2012. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22267544> >.

EDWARDS, J. E. et al. A Fungal Immunotherapeutic Vaccine (NDV-3A) for Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis-A Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Clin Infect Dis**, v. 66, n. 12, p. 1928-1936, Jun 2018. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29697768> >.

FELIPE, M. S. et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 26, p. 24706-14, Jul 1 2005.

FELTES, T. F. et al. A randomized controlled trial of motavizumab versus palivizumab for the prophylaxis of serious respiratory syncytial virus disease in children with hemodynamically significant congenital heart disease. **Pediatr Res**, v. 70, n. 2, p. 186-91, Aug 2011. ISSN 1530-0447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21522037> >.

FORTES, M. R. et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 3, p. 516-24, 2011 May-Jun 2011. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21738969> >.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 20, n. 2, p. 129-32, 1987 Apr-Jun 1987. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3507739> >.

FUENTEFRÍA, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Lett Appl Microbiol**, v. 66, n. 1, p. 2-13, Jan 2018. ISSN 1472-765X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29112282> >.

GARVEY, E. P. et al. Efficacy of the clinical agent VT-1161 against fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans* in a murine model of vaginal candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 9, p. 5567-73, Sep 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124165> >.

GOLDANI, L. Z.; SUGAR, A. M. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. **Clin Infect Dis**, v. 21, n. 5, p. 1275-81, Nov 1995. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8589154> >.

GOLSAZ SHIRAZI, F. et al. Monoclonal antibodies to various epitopes of hepatitis B surface antigen inhibit hepatitis B virus infection. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 29, n. 5, p. 1083-91, May 2014. ISSN 1440-1746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24325676> >.

GOW, N. A. A developmental program for *Candida* commensalism. **Nat Genet**, v. 45, n. 9, p. 967-8, Sep 2013. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23985683> >.

GOW, N. A.; HUBE, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Curr Opin Microbiol**, v. 15, n. 4, p. 406-12, Aug 2012. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22609181> >.

HAMASUR, B. et al. A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its F(ab') fragment prolong survival of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Exp Immunol**, v. 138, n. 1, p. 30-8, Oct 2004. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15373902> >.

HAYNES, B. F. et al. Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. **Science**, v. 308, n. 5730, p. 1906-8, Jun 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15860590> >.

HESSELL, A. J. et al. Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 5, p. e1000433, May 2009. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436712> >.

\_\_\_\_\_. Broadly neutralizing monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 directed against the human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region protect against mucosal challenge by simian-human immunodeficiency virus SHIVBa-L. **J Virol**, v. 84, n. 3, p. 1302-13, Feb 2010. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19906907> >.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annu Rev Biochem**, v. 54, p. 237-71, 1985. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3896121> >.

HUA, L. et al. Assessment of an anti-alpha-toxin monoclonal antibody for prevention and treatment of Staphylococcus aureus-induced pneumonia. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 2, p. 1108-17, 2014. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24295977> >.

HUBE, B. Fungal adaptation to the host environment. **Curr Opin Microbiol**, v. 12, n. 4, p. 347-9, Aug 2009. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577508> >.

HULL, C. M.; HEITMAN, J. Genetics of Cryptococcus neoformans. **Annu Rev Genet**, v. 36, p. 557-615, 2002. ISSN 0066-4197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429703> >.

IANIRI, G.; IDNURM, A. Essential gene discovery in the basidiomycete Cryptococcus neoformans for antifungal drug target prioritization. **MBio**, v. 6, n. 2, Mar 2015. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25827419> >.

IBRAHIM, A. S. et al. Vaccination with recombinant N-terminal domain of Als1p improves survival during murine disseminated candidiasis by enhancing cell-mediated, not humoral, immunity. **Infect Immun**, v. 73, n. 2, p. 999-1005, Feb 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15664943> >.

IDNURM, A. et al. Deciphering the model pathogenic fungus Cryptococcus neoformans. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 753-64, Oct 2005. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16132036> >.

JENSEN-PERGAKES, K. L. et al. Sequencing, disruption, and characterization of the Candida albicans sterol methyltransferase (ERG6) gene: drug susceptibility studies in erg6 mutants. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 5, p. 1160-7, May 1998. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593144> >.

JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C. et al. Enfumafungin derivative MK-3118 shows increased in vitro potency against clinical echinocandin-resistant *Candida* Species and *Aspergillus* species isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 2, p. 1248-51, 2014. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24323472> >.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 1, p. 120-8, Jan 2008. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171227> >.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochim Pol**, v. 56, n. 2, p. 211-24, 2009. ISSN 1734-154X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19543556> >.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorg Med Chem**, v. 20, n. 19, p. 5678-98, Oct 2012. ISSN 1464-3391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22902032> >.

KITAMURA, A. Discovery and characterization of  $\beta$ -1,6-glucan inhibitors. **Expert Opin Drug Discov**, v. 5, n. 8, p. 739-49, Aug 2010. ISSN 1746-045X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22827797> >.

KLEIN, F. et al. Antibodies in HIV-1 vaccine development and therapy. **Science**, v. 341, n. 6151, p. 1199-204, Sep 2013. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24031012> >.

KUMAR, C. et al. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. **EMBO J**, v. 30, n. 10, p. 2044-56, May 2011. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478822> >.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 7, p. a019760, Jul 2014. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24985132> >.

KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R.; LEVITZ, S. M. A chronological history of the International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis (ICCC), an invaluable forum for growth of the cryptococcal research field and clinical practice. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 287-93, Jun 2012. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22038679> >.

LAGOS, R. et al. Safety and antiviral activity of motavizumab, a respiratory syncytial virus (RSV)-specific humanized monoclonal antibody, when administered to RSV-infected children. **Pediatr Infect Dis J**, v. 28, n. 9, p. 835-7, Sep 2009. ISSN 1532-0987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19636278> >.

LEE, S.; KIM, S. M.; LEE, R. T. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 10, p. 1165-207, Apr 2013. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22607099> >.

LEPAK, A. J.; MARCHILLO, K.; ANDES, D. R. Pharmacodynamic target evaluation of a novel oral glucan synthase inhibitor, SCY-078 (MK-3118), using an in vivo murine invasive candidiasis model. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 2, p. 1265-72, Feb 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512406> >.

LI, X. et al. Potential Targets for Antifungal Drug Discovery Based on Growth and Virulence in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 10, p. 5885-91, Oct 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26195510> >.

LIN, L. et al. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 12, p. e1000703, Dec 2009. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20041174> >.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 4, p. 401-16, Jul 2009. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460306> >.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704346> >.

LONGO, L.V.G. et al. Proteome of cell wall-extracts from pathogenic *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparison among morphological phases, isolates, and reported fungal extracellular vesicle proteins. **EuPa Open Proteomics**, v. 3, p. 216-228, 2013. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212968514000245> >

LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radic Biol Med**, v. 66, p. 75-87, Jan 2014. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23899494> >.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **Clin Microbiol Infect**, v. 10 Suppl 1, p. 1-10, Mar 2004. ISSN 1198-743X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14748798> >.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis. **Clin Dermatol**, v. 30, n. 6, p. 610-5, 2012 Nov-Dec 2012. ISSN 1879-1131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23068148> >.

MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 1, Jan 2017. ISSN 2309-608X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371520> >.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73, Jan 2006. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151188> >.

MAUBON, D. et al. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive Care Med**, v. 40, n. 9, p. 1241-55, Sep 2014. ISSN 1432-1238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25091787> >.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-28, Feb 2013. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302789> >.

MCCLELLAND, E. E. et al. Ab binding alters gene expression in *Cryptococcus neoformans* and directly modulates fungal metabolism. **J Clin Invest**, v. 120, n. 4, p. 1355-61, Apr 2010. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20335660> >.

MEDICI, N. P.; DEL POETA, M. New insights on the development of fungal vaccines: from immunity to recent challenges. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 966-73, Dec 2015. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26602871> >.

MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **Open Microbiol J**, v. 11, p. 224-282, 2017. ISSN 1874-2858. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29204222> >.

MENG, W. et al. Rapid Generation of Human-Like Neutralizing Monoclonal Antibodies in Urgent Preparedness for Influenza Pandemics and Virulent Infectious Diseases. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66276, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23824680> >.

MISSALL, T. A.; LODGE, J. K. Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 2, p. 487-9, Feb 2005. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15701811> >.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 51-83, Mar 2016. ISSN 1557-9824. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26739608> >.

NICOLA, A. M. et al. Antifungal drugs: New insights in research & development. **Pharmacol Ther**, Oct 2018. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30347212> >.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell Microbiol**, v. 5, n. 4, p. 203-23, Apr 2003. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12675679> >.

OKUNO, Y. et al. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2 strains. **J Virol**, v. 67, n. 5, p. 2552-8, May 1993. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682624> >.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **Am J Pathol**, v. 164, n. 5, p. 1761-71, May 2004. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111322> >.

PAPPAS, P. G. Antifungal Trials: Progress, Approaches, New Targets and Perspectives in Cryptococcosis. In: HEITMAN, J.; KOZEL, T. R., et al (Ed.). **Cryptococcus from human pathogen to model yeast**. Washington: ASM Press, 2011. p.27-41.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 62, n. 4, p. e1-50, Feb 2016. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26679628> >.

\_\_\_\_\_. Invasive candidiasis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 4, p. 18026, May 2018. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29749387> >.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 2009. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676> >.

PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 49-54, May 2015. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25312862> >.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047480> >.

PETTIT, N. N.; CARVER, P. L. Isavuconazole: A New Option for the Management of Invasive Fungal Infections. **Ann Pharmacother**, v. 49, n. 7, p. 825-42, Jul 2015. ISSN 1542-6270. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940222> >.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 133-63, Jan 2007. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223626> >.

PFALLER, M. A. et al. Activity of MK-3118, a new oral glucan synthase inhibitor, tested against *Candida* spp. by two international methods (CLSI and EUCAST). **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 4, p. 858-63, Apr 2013. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190764> >.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. *Candida* survival strategies. **Adv Appl Microbiol**, v. 91, p. 139-235, 2015. ISSN 0065-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25911234> >.

POLONELLI, L. et al. Monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal anti-idiotypic antibodies. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 4, n. 2, p. 142-6, Mar 1997. ISSN 1071-412X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9067647> >.

POULAIN, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. **Crit Rev Microbiol**, v. 41, n. 2, p. 208-17, Jun 2015. ISSN 1549-7828. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23962107> >.

PUIA-DUMITRESCU, M.; SMITH, P. B. Antifungal Drugs in Newborns and Children. **Pediatr Clin North Am**, v. 64, n. 6, p. 1389-1402, Dec 2017. ISSN 1557-8240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29173792> >.

PUKKILA-WORLEY, R. et al. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 11, p. 1750-8, Nov 2009. ISSN 1535-9786 (Electronic)

1535-9786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666778> >.

RACHINI, A. et al. An anti-beta-glucan monoclonal antibody inhibits growth and capsule formation of *Cryptococcus neoformans* in vitro and exerts therapeutic, anticryptococcal activity in vivo. **Infect Immun**, v. 75, n. 11, p. 5085-94, Nov 2007. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17606600> >.

RAMILO, O. et al. Motavizumab treatment of infants hospitalized with respiratory syncytial virus infection does not decrease viral load or severity of illness. **Pediatr Infect Dis J**, v. 33, n. 7, p. 703-9, Jul 2014. ISSN 1532-0987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356256> >.

REICHERT, J. M. Antibody-based therapeutics to watch in 2011. **MAbs**, v. 3, n. 1, p. 76-99, 2011 Jan-Feb 2011. ISSN 1942-0870. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21051951> >.

\_\_\_\_\_. Antibodies to watch in 2017. **MAbs**, v. 9, n. 2, p. 167-181, 2017 Feb/Mar 2017. ISSN 1942-0870. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27960628> >.

REVIE, N. M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Curr Opin Microbiol**, v. 45, p. 70-76, Mar 2018. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29547801> >.

RITTNER, G. M. et al. Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1519, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389734> >.

ROEMER, T. et al. Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. **Mol Microbiol**, v. 50, n. 1, p. 167-81, Oct 2003. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14507372> >.

RUHNKE, M. Antifungal stewardship in invasive *Candida* infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 20 Suppl 6, p. 11-8, Jun 2014. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24661820> >.

SABLE, C. A.; STROHMAIER, K. M.; CHODAKEWITZ, J. A. Advances in antifungal therapy. **Annu Rev Med**, v. 59, p. 361-79, 2008. ISSN 0066-4219 (Print)

0066-4219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17967129> >.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, v. 40, n. 3, p. 225-42, Jun 2002. ISSN 1369-3786 (Print)

1369-3786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12146752> >.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of Candida species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 73-85, Feb 2002. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11901654> >.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58 Suppl 2, p. 2-13, Jun 2015. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26033251> >.

SAYLOR, C.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases. **Vaccine**, v. 27 Suppl 6, p. G38-46, Dec 2009. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20006139> >.

SCORZONI, L. et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. **Front Microbiol**, v. 8, p. 36, 2017. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28167935> >.

SEYEDMOUSAVI, S.; VERWEIJ, P. E.; MOUTON, J. W. Isavuconazole, a broad-spectrum triazole for the treatment of systemic fungal diseases. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 13, n. 1, p. 9-27, Jan 2015. ISSN 1744-8336. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25488140> >.

SHAHID, S. K. Newer patents in antimycotic therapy. **Pharm Pat Anal**, v. 5, n. 2, p. 115-34, 2016. ISSN 2046-8962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26900731> >.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 75, n. 2, p. 213-67, Jun 2011. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646428> >.

SHEMBEKAR, N. et al. Humanized antibody neutralizing 2009 pandemic H1N1 virus. **Biotechnol J**, v. 9, n. 12, p. 1594-603, Dec 2014. ISSN 1860-7314. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25044602> >.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017 Sep-Oct 2017. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28746570> >.

\_\_\_\_\_. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006 May-Jun 2006. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16906260> >.

SILVA, L. B. R. et al. Dendritic Cells Primed with. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1057, 2017. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28659882> >.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 10, p. 5127-30, Oct 2013. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23836187> >.

SKINNER, C. et al. New high-affinity monoclonal antibodies against Shiga toxin 1 facilitate the detection of hybrid Stx1/Stx2 in vivo. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99854, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914553> >.

SPELLBERG, B. J. et al. The anti-*Candida albicans* vaccine composed of the recombinant N terminus of Als1p reduces fungal burden and improves survival in both immunocompetent and immunocompromised mice. **Infect Immun**, v. 73, n. 9, p. 6191-3, Sep 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113347> >.

SPITZER, M. et al. Cross-species discovery of syncretic drug combinations that potentiate the antifungal fluconazole. **Mol Syst Biol**, v. 7, p. 499, Jun 2011. ISSN 1744-4292. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21694716> >.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47-60, Feb 2014. ISSN 1097-0061. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375706> >.

STEELE, J. et al. Antibody against TcdB, but not TcdA, prevents development of gastrointestinal and systemic *Clostridium difficile* disease. **J Infect Dis**, v. 207, n. 2, p. 323-30, Jan 2013. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23125448> >.

SUBRAMANIAM, K. S. et al. The absence of serum IgM enhances the susceptibility of mice to pulmonary challenge with *Cryptococcus neoformans*. **J Immunol**, v. 184, n. 10, p. 5755-67, May 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404271> >.

TAN, S. X. et al. The thioredoxin-thioredoxin reductase system can function in vivo as an alternative system to reduce oxidized glutathione in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 285, n. 9, p. 6118-26, Feb 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19951944> >.

TAN, Y. et al. A novel humanized antibody neutralizes H5N1 influenza virus via two different mechanisms. **J Virol**, v. 89, n. 7, p. 3712-22, Apr 2015. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609802> >.

TAYLOR-SMITH, L. M.; MAY, R. C. New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. **Curr Opin Microbiol**, v. 34, p. 67-74, Dec 2016. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27522351> >.

TEITELBAUM, R. et al. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 26, p. 15688-93, Dec 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861031> >.

TEIXEIRA, M. E. M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Med Mycol**, v. 52, n. 1, p. 19-28, Jan 2014. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23768243> >.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol**, v. 52, n. 2, p. 273-83, Aug 2009. ISSN 1095-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376249> >.

\_\_\_\_\_. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 10, p. e1004397, Oct 2014. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25357210> >.

THÖN, M. et al. The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: impact on development and oxidative stress response. **J Biol Chem**, v. 282, n. 37, p. 27259-69, Sep 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17631497> >.

TKACZYK, C. et al. Identification of anti-alpha toxin monoclonal antibodies that reduce the severity of *Staphylococcus aureus* dermonecrosis and exhibit a correlation between affinity and

potency. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 3, p. 377-85, Mar 2012. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237895> >.

TOLEDANO, M. B. et al. Functions and cellular compartmentation of the thioredoxin and glutathione pathways in yeast. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 13, p. 1699-711, May 2013. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23198979> >.

TRAGIANNIDIS, A. et al. Invasive candidiasis: update on current pharmacotherapy options and future perspectives. **Expert Opin Pharmacother**, v. 14, n. 11, p. 1515-28, Aug 2013. ISSN 1744-7666. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23724798> >.

TRKOLA, A. et al. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. **J Virol**, v. 70, n. 2, p. 1100-8, Feb 1996. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8551569> >.

TROFA, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. Melanin: Structure, Function and Biosynthesis in *Cryptococcus*. In: PRESS, A. (Ed.). ***Cryptococcus from human pathogen to model yeast.***, 2011. p.55-65.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genet Biol**, v. 106, p. 9-25, Sep 2017. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28602831> >.

TURNER, S. A.; BUTLER, G. The *Candida* pathogenic species complex. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 9, p. a019778, Sep 2014. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183855> >.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 713687, 2012. ISSN 1687-9198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22187560> >.

VILANOVA, M. et al. Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2. **Immunology**, v. 111, n. 3, p. 334-42, Mar 2004. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009435> >.

WEISMAN, L. E. et al. A randomized study of a monoclonal antibody (pagibaximab) to prevent staphylococcal sepsis. **Pediatrics**, v. 128, n. 2, p. 271-9, Aug 2011. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21788224> >.

WILEY, D. C.; WILSON, I. A.; SKEHEL, J. J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. **Nature**, v. 289, n. 5796, p. 373-8, Jan 1981. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6162101> >.

WILLIAMS, C. H. et al. Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 20, p. 6110-7, Oct 2000. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11012662> >.

WÄCHTLER, B. et al. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17046, Feb 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21407800> >.

XANDER, P. et al. A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. **Microbes Infect**, v. 9, n. 12-13, p. 1484-92, Oct 2007. ISSN 1286-4579 (Print)

1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17913543> >.

ZHAI, B. et al. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 7, p. 3758-66, Jul 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22508310> >.

ZHONG, L.; ARNÉR, E. S.; HOLMGREN, A. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 11, p. 5854-9, May 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801974> >.