

LUCIANA THOMAZ

**Proteção ou exacerbação de anticorpos monoclonais  
gerados contra antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*  
na infecção experimental**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2012

LUCIANA THOMAZ

**Proteção ou exacerbação de anticorpos  
monoclonais gerados contra antígenos de  
*Paracoccidioides brasiliensis* na infecção  
experimental**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Carlos Pelleschi Taborda  
Versão original

São Paulo  
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Thomaz, Luciana.

Proteção ou exacerbação de anticorpos monoclonais gerados  
contra antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* na infecção  
experimental / Luciana Thomaz. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências  
Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração:  
Microbiologia. Linha de pesquisa: Relação parasito-hospedeiro,  
micologia, anticorpos monoclonais.

Versão do título para o inglês: Protection or exacerbation of  
monoclonal antibodies generated against antigens of *Paracoccidioides  
brasiliensis* in the experimental infection.

1. Micologia 2. Microbiologia 3. Fungos I. Taborda, Prof. Dr.  
Carlos Pelleschi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências  
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0123/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Luciana Thomaz.

Título da Tese: Proteção ou exacerbação de anticorpos monoclonais gerados contra antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* na infecção experimental.

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

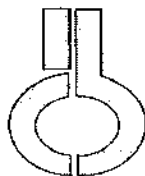
Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438  
e-mail: rep@icb.usp.br

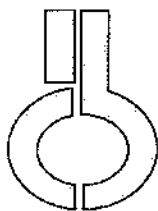
## **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **030** nas fls. **44** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Carlos Pelleschi Tabora** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Eficácia, função biológica, proteção ou exacerbação de anticorpos monoclonais gerados contra antígenos de paracoccidioides brasiliensis na infecção experimental**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Luciana Tomaz**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **27.03.2007**.

São Paulo, 28 de março de 2007.

Prof. Dr. CARLOS PELLESCI TABORDA  
Vice - Coordenador da  
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI  
Secretária da  
CEEA - ICB/USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

**Of.CEUA.49.10**

WTL/mcgn

São Paulo, 03 de agosto de 2010.

**REF.: Protocolo nº030/07.**

*"Eficácia, função biológica, proteção ou exacerbação de anticorpos monoclonais gerados contra antígenos de paracoccidioides brasiliensis na infecção experimental"*

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 27.03.2013.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da Comissão de Ética  
no Uso de Animal - ICB /USP

Ilmo.Sr.

Prof. Dr. CARLOS PELLESCI TABORDA

Departamento de Microbiologia

Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*Ao meu marido, Renato, pela presença, suporte e amor*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Carlos Pelleschi Taborda, exemplo de dedicação e seriedade na pesquisa, que me recebeu em seu laboratório, me orientou, ensinou e incentivou. Obrigado pelos ensinamentos, pois tudo que sei, certamente é a quem devo agradecer.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo e aos professores Elizabeth de Gaspari, Elaine G. Rodrigues, Gil Benard, Sandro Rogério de Almeida, Primavera Borelli, Roxane Piazza. Ao professor Philip Albert James Gorin pela análise dos monossocarídeos.

Ao professor Doutor Joshua Nosanchuk por ter me recebido em seu laboratório, por acreditar em meu trabalho, por ver pontos positivos sempre nos resultados, pela paciência com o idioma, por ter sido um amigo. Aos alunos do laboratório do prof. Josh, em especial ao David Sanchez pelo apoio técnico e pela sincera amizade e a Mariangela. Aos alunos do laboratório do Professor Arturo Casadevall, em especial ao Jacky pela contribuição científica e a Monica Garcia por me ensinar a trabalhar com invertebrados.

Ao técnico do biotério Carlos Augusto da Silva pela sua dedicação e extremo cuidado com os animais durante todos esses anos de pesquisa.

Aos secretários do Departamento de Microbiologia e da Pós-Graduação, respectivamente: Alice e Elizabeth Ribeiro, Ana Maria Amaral, Naíde Farripas e Celso Pereira, por seus préstimos, amizade e gentileza no atendimento.

Aos funcionários da Seção de Esterilização: José, Elaines, Carloina, Claudia pela colaboração e apoio técnico e aos funcionários da limpeza e manutenção pelo trabalho e dedicação.



Ao Paulo Albe responsável pelo setor de Histotecnologia, ao Gaspar e Edson responsáveis pelos serviços da microscopia eletrônica do ICB e a Claudia pela ajuda com a cromatografia.

Aos funcionários do Serviço de Biblioteca do ICB pela ajuda e gentileza no atendimento.

A todos meus amigos do laboratório, co-responsáveis de alguma maneira pela realização deste trabalho: Adelaide, Adriana Magalhães, Adriana Menezes, Daniel Assis, Diego Rossi, Felipe Augusto, Glauce M. G. Rittner, Juliana Amorim, Lucas Marques, Luiz Farinha, Martha Uran, Oriana Mayorda, Renata Bueno, Thales, Thor Andreas pelo convívio, trabalho discussões e apoio durante esses anos de Pós-Graduação.

A Marcia Ribeiro pelos ensinamentos e paciência em ensinar-me diversas coisas que fiz nesse trabalho, a Fernanda Dias pelas nossas discussões, pela correção do presente trabalho, as duas pelo carinho e amizade, meu muito obrigada.

A Julian Esteban, Leandro Buffoni, Paula Martinelli e Viviana Sarria pela ajuda na parte experimental e discussões.

À Shirlei A. Vieira Marques pelo suporte técnico e disposição em me ajudar, uma grande amiga, Muito obrigada.

Ao Danilo pelas informações técnicas de glicoconjugados e a professora Sirley da Parasitologia por permitir o uso de alguns equipamentos de seu laboratório.

A toda minha família, meus pais e minha irmã que contribuíram para meu desenvolvimento ao longo dos anos. A minhas amigas Lilian Walsh Keller e Viviane Sales pelo carinho e debates científicos.

Ao meu marido, Renato, pela compreensão carinho, amor, disposição e paciência em discutir microbiologia nos jantares românticos, fornecendo seu olhar

empresarial como crítica construtiva, por estar ao meu lado contribuindo para meu crescimento. Te amo.

Ao apoio financeiro da FAPESP pelo auxílio à pesquisa, possibilitando a realização deste trabalho e ao apoio financeiro do CNPq e CAPES.

E finalmente, a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Thomaz, L. Proteção ou exacerbação de anticorpos monoclonais gerados contra antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* na infecção experimental. [tese (Doutorado em Microbiologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2012.

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico, o qual depende da conversão de micélio para levedura para iniciar o processo de doença. Micose endêmica de caráter granulomatoso, ocupa o décimo lugar dentre as doenças infecto-parasitárias que mais causam morte no Brasil. As taxas de recidivas e o longo período de tratamento estimula a busca por novas alternativas terapêuticas, entre elas o uso de anticorpos monoclonais. As principais funções das imunoglobulinas são: (I) neutralizar e (II) opsonizar antígenos favorecendo a fagocitose por células com receptores de porções Fc, (III) ativar o sistema complemento, gerando subprodutos; os quais amplificam a ligação antígeno-anticorpo-receptor, (IV) fazer parte do processo de citotoxicidade mediado por células dependentes de anticorpos e (V) servir como receptor de membrana de linfócito B. Imunidade mediada por anticorpos monoclonais podem ser protetoras em doenças de natureza fúngica como na paracoccidioidomicose experimental. Nesse trabalho avaliamos a proteção que o anticorpo monoclonal contra CMH fornece aos animais infectados com as leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*. O tratamento profilático com IgG2a foi eficiente em conter as leveduras no interior dos granulomas bem organizados, reduzindo os danos teciduais nos pulmões dos camundongos da linhagem BALB/c, bem como induziu a secreção das citocinas IL-12p70, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , o que demonstra que CMH é uma molécula alvo de potencial terapêutico. Nós mostramos que moléculas de CMH estão acessíveis na estrutura fúngica e o anticorpo monoespecífico gerado nesse trabalho foi eficaz nos ensaios *in vitro* de proteção, aumentando os níveis de fagocitose, reduzindo o número de células viáveis com o aumento da produção de óxido nítrico. Os anticorpos policlonais contra melanina, também gerado nesse estudo, foram eficazes em ativar os macrófagos a fagocitar e reduziu a viabilidade de leveduras de *P. brasiliensis*. Usamos também dois isotipos de AcM contra Hsp60, 4E12, IgG2a e 7B6, IgG2b, os dois isotipos mostraram ser protetores em modelo profilático contra o desafio de leveduras de *P. lutzii*, o AcM 4e12 exibiu melhor quadro de proteção, com níveis de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12p70 superiores aos encontrados para o grupo tratado com o AcM 7B6. Proteínas de Hsp60 estão dispersas por toda a estrutura fúngica, sendo um alvo terapêutico, bem como CMH. Este estudo indica que os anticorpos monoclonais de isotipo IgG2a e IgG2b são protetores no modelo de PCM experimental. Foram gerados anticorpos monoclonais contra glicoproteína extraída por hidrólise alcalina de Pb18, o anticorpo monoclonal de isotipo IgG1 reconheceu, por imunomarcção, estruturas internas e a parede celular da levedura. Avaliamos também um novo modelo de hospedeiro, com o uso da larva *Galleria mellonella*, o que pode servir de triagem e reduzir desta forma o uso excessivo de camundongos, esse modelo ainda encontra-se em padronização, no entanto as leveduras termodimórficas, *P. lutzii* e *H. capsulatum* são letais para as larvas e evocam resposta celular que se organizam semelhante a um granuloma como é visto no modelo animal.

Palavras chave: *Paracoccidioides brasiliensis*. *Paracoccidioides lutzii*. Anticorpo monoclonal. *Galleria mellonella*.

## ABSTRACT

Thomaz, L. Protection or exacerbation of monoclonal antibodies generated against antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in the experimental infection. [Ph. D. thesis] (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2012.

*Paracoccidioides brasiliensis* is a dimorphic fungal, which depends on the conversion of mycelium for yeast to initiate the disease process. A granulomatous mycosis of endemic character. The mycosis occupy the tenth place among the infectious and parasitic diseases that cause deaths in Brazil. The recurrence rate, long-term treatment encourages the search for new therapies, among these therapies is the use of monoclonal antibodies. The main functions of immunoglobulins are: (I) neutralizing and (II) opsonizing the antigens, leading phagocytosis by the cells with Fc receptors portions, (III) activating the complement system generates; this generates sub products which enhance the antigen-antibody- receptor connection, (IV) being a part of the cytotoxicity mediated by cells which depend of the antibodies and (V) serving as the membrane receptor of B lymphocytes. Immunity mediated by monoclonal antibody may be protective in fungal diseases like in experimental paracoccidioidomycosis. In this work we evaluated the protection that the monoclonal antibody to CMH provides the animals infected with the yeast *Paracoccidioides brasiliensis*. Prophylactic treatment with IgG2a was effective in containing the yeast inside the well-organized granulomas, reducing tissue damage in the lungs of mice of the BALB / c mice and induced the secretion of IL-12p70, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , which demonstrates that CMH is a target molecule of therapeutic potential. We have shown that CMH molecules are accessible on the structure fungal. The monospecific antibody generated in this work was effective in *in vitro* tests of protection, increasing levels of phagocytosis, reducing the number of viable cells with increased production of nitric oxide. Polyclonal antibodies against melanin, also generated in this study, were effective in activating macrophages to phagocytes and reduce the viability the *P. brasiliensis*. We also used two isotypes of MAbs against Hsp60: 4E12 (IgG2a), and 7B6 (IgG2b), both isotypes were shown to be protective in prophylactic model against challenge with yeast *P. lutzii*, the MAb 4E12 exhibited better framework for protection, with levels of cytokines IFN- $\gamma$  and IL-12p70 than those found for the group treated with MAb 7B6. Hsp60 proteins are dispersed throughout the structure fungal, and a therapeutic target and CMH. This study indicates that the monoclonal antibodies of isotype IgG2a and IgG2b are protective in experimental model PCM. Monoclonal antibodies were generated against the glycoprotein that was extracted by alkaline hydrolysis of Pb18, the monoclonal antibody of IgG1 isotype recognized by immunolabelling, internal structures and cell wall. We also evaluated a new type of host, using the larvae *Galleria mellonella*, which can be used in the screening tests, thus can reduce the number of mice. This model is still in the standardization, but the yeast thermodimorphic, *P. lutzii* and *H. capsulatum* are lethal and may evoke the response cell, which resembles the granuloma-like, as seen in the animal model.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*. *Paracoccidioides lutzii*. Monoclonal antibody. *Galleria mellonella*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Tabela 1</b> - Volumes e concentrações dos reagentes utilizados na conjugação do polissacarídeo-proteína.....	55
<b>Tabela 2</b> - Perfil monossacarídeo de diferentes isolados de <i>P. brasiliensis</i> .....	70
<b>Figura 1</b> - Sequência da extração alcalina com KOH 2% de diferentes isolados de <i>P. brasiliensis</i> .....	43
<b>Figura 2</b> - Sequência da extração de CMH de <i>P. brasiliensis</i> isolado 18.....	47
<b>Figura 3</b> - Cromatograma referente à análise da amostra extraída por hidrólise alcalina de <i>P. brasiliensis</i> , isolado 18.....	72
<b>Figura 4</b> - Diâmetro médio das moléculas da amostra extraída por hidrólise alcalina de <i>P. brasiliensis</i> , isolado 18 em solução de KCl em 0, 1, 10 e 100 mM.....	73
<b>Figura 5</b> - Potencial Zeta da amostra extraída por hidrólise alcalina de <i>P. brasiliensis</i> , isolado 18, em solução de KCl em 0, 1, 10 e 100 mM.....	74
<b>Figura 6</b> - Fotomicrografia óptica (aumento de 1000x) de <i>P. brasiliensis</i> cultivados na ausência (A) e presença (B) de L-DOPA.....	75
<b>Figura 7</b> - Fotomicrografia óptica (aumento de 1000x) de melanina “ghost” proveniente de <i>P. brasiliensis</i> .....	76
<b>Figura 8</b> - Cromatografia em camada delgada das fases provenientes da partição de Folch e do fracionamento da fase inferior de Folch em sílica gel 60, com os solventes: clorofórmio, acetona e metanol.....	77
<b>Figura 9</b> - Cromatografia em camada delgada do CMH purificado a partir do extrato lipídico bruto de <i>P. brasiliensis</i> .....	79
<b>Figura 10</b> - Perfil de IgG e IgM no período de imunização com CMH em camundongos BALB/c.....	80
<b>Figura 11</b> - Perfil de IgG e IgM em diluições seriadas, no último dia de imunização com CMH em camundongos BALB/c.....	80
<b>Figura 12</b> - Perfil de IgG e IgM no período de imunização com melanina em camundongos BALB/c.....	81
<b>Figura 13</b> - Perfil de IgG e IgM em diluições seriadas, no último dia de imunização com melanina em camundongo BALB/c.....	82
<b>Figura 14</b> - Perfil de IgG e IgM no período de imunização com antígeno glicoproteico, homogeneizado com o adjuvante derivado de saponina, Quil A, derivado de <i>P. brasiliensis</i> em camundongos BALB/c.....	83
<b>Figura 15</b> - Perfil de IgG e IgM em diluições seriadas, no último dia de imunização com glicoproteína derivada de <i>P. brasiliensis</i> em camundongo BALB/c.....	84

<b>Figura 16</b> - Perfil das concentrações séricas de IgG e IgM de camundongos BALB/c imunizados com o antígeno glicoproteico derivado de <i>P. brasiliensis</i> conjugado com KLH e emulsificados com adjuvante de Freund.....	85
<b>Figura 17</b> - Cromatograma referente á análise da amostra glicoproteica, extraída da parede celular de <i>P. brasiliensis</i> , conjugada com BSA.....	86
<b>Figura 18</b> - Cromatograma referente á análise da amostra glicoproteica, extraída de <i>P. brasiliensis</i> , conjugada e não conjugada com BSA.....	87
<b>Figura 19</b> - Cromatograma referente à análise da amostra glicoproteica, extraída de <i>P. brasiliensis</i> .....	87
<b>Figura 20</b> - Fotomicrografia óptica (aumento de 400x), em microscópio invertido (BIOVAL, SDS-1B), dos hibridomas contra CMH, gerados no protocolo 1.....	90
<b>Figura 21</b> - Fotomicrografia óptica (aumento de 400x), em microscópio invertido (BIOVAL, SDS-1B), dos hibridomas contra CMH, gerados no protocolo 1.....	90
<b>Figura 22</b> - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do eluído da purificação por PVDF de sobrenadante de cultura de hibridomas contra CMH.....	92
<b>Figura 23</b> - Fotomicrografia óptica (aumento de 400x), em microscópio invertido (BIOVAL, SDS-1B), dos hibridomas contra melanina, gerados no protocolo 5.....	93
<b>Figura 24</b> – Perfil das concentrações séricas de IgM (eixo x – 1 ao 15) e IgG dos clones obtidos contra glicoproteína derivada de <i>P. brasiliensis</i> (isolado 18), na diluição 1:100.....	95
<b>Figura 25</b> - Índice de Fagocitose, o ensaio foi realizado utilizando-se a linhagem de macrófagos peritoneal-murino (J774.16), previamente ativados com IFN- $\gamma$ (50 U/ml), frente a leveduras de Pb18 e 100 $\mu$ g/ml do anticorpo monoespecífico contra CMH, por 12 horas, e o anticorpo controle, 12A1.....	97
<b>Figura 26</b> – Ensaio de viabilidade celular, o ensaio foi realizado em paralelo a fagocitose, utilizando-se a linhagem de macrófagos peritoneal-murino (J774.16), frente a leveduras de Pb18 e 100 $\mu$ g/ml do anticorpo monoespecífico contra CMH, por 12 horas, e o anticorpo controle, 12A1. Após o período de incubação cada poço foi plaqueado em meio preconizado.....	98
<b>Figura 27</b> - Determinação da produção de nitrito. Macrófagos J774.16 foram incubados na presença de leveduras Pb18, na presença de anticorpo monoespecífico contra CMH e anticorpo monoclonal irrelevante (12A1), por 12 horas. Após esse período foi realizada a dosagem de nitritos no sobrenadante de cultura, através de microensaio por reagente de Griess.....	99
<b>Figura 28</b> - Microscopia eletrônica de transmissão. Detecção da molécula de CMH nas estruturas internas de <i>P. brasiliensis</i> , isolado 18, através do anticorpo monoespecífico contra CMH.....	100
<b>Figura 29</b> - Índice de Fagocitose, o ensaio foi realizado utilizando-se a linhagem de macrófagos peritoneal-murino (J774.16), previamente ativados com IFN- $\gamma$ (50 U/ml), frente a leveduras de Pb18 e com 100 $\mu$ g/ml dos anticorpos policlonais, por 12 horas, e os anticorpos irrelevantes, IgG e IgM, como controles.....	101

- Figura 30** - Ensaio de viabilidade celular, o ensaio foi realizado em paralelo a fagocitose, utilizando-se a linhagem de macrófagos peritoneal-murino (J774.16), frente a leveduras de Pb18 e com 100 µg/ml dos anticorpos policlonais, por 12 horas, e os anticorpos irrelevantes, IgG e IgM, como controles. Após o período de incubação cada poço foi plaqueado em meio preconizado.....102
- Figura 31** - Histopatologia dos pulmões dos camundongos BALB/c infectados com Pb18 e tratados com anticorpo monoclonal α-CMH, e anticorpo irrelevante, A4, após 15 dias da infecção intratraqueal.....104
- Figura 32** - Histopatologia dos pulmões dos camundongos BALB/c infectados com Pb18 e tratados com anticorpo monoclonal α-CMH, e anticorpo irrelevante, A4, após 30 dias da infecção intratraqueal.....105
- Figura 33** - Histopatologia dos pulmões dos camundongos BALB/c infectados com Pb18 e tratados com anticorpo monoclonal α-CMH, e anticorpo irrelevante, A4, após 60 dias da infecção intratraqueal.....106
- Figura 34** – Unidades formadoras de colônia de pulmões de camundongos BALB/c que receberam 1 mg de AcM α-CMH ou A4, 24 horas antes da infecção com Pb18 e sacrificados após 15, 30 e 60 dias da infecção.....108
- Figura 35** - Quantificação de IL-4 pelo método de ELISA presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com AcM contra CMH e AcM irrelevante (A4), após 15, 30 e 60 dias após a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.....109
- Figura 36** - Quantificação de IL-10 pelo método de ELISA presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com AcM contra CMH e AcM irrelevante (A4), após 15, 30 e 60 dias após a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.....110
- Figura 37** - Quantificação de IL-12p40 pelo método de ELISA presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com AcM contra CMH e AcM irrelevante (A4), após 15, 30 e 60 dias após a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.....111
- Figura 38** - Quantificação de IL-12p70 pelo método de ELISA presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com AcM contra CMH e AcM irrelevante (A4), após 15, 30 e 60 dias após a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.....112
- Figura 39** - Quantificação de TNF-α pelo método de ELISA presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com AcM contra CMH e AcM irrelevante (A4), após 15, 30 e 60 dias após a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.....113
- Figura 40** - Quantificação de IFN-γ pelo método de ELISA presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com AcM contra CMH e AcM irrelevante (A4), após 15, 30 e 60 dias após a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.....114

<b>Figura 41</b> – Microscopia eletrônica de transmissão. Detecção da molécula de CMH nas estruturas internas de <i>P. brasiliensis</i> , isolado 18, através do anticorpo monoclonal $\alpha$ -CMH contra CMH.....	116
<b>Figura 42</b> – Microscopia eletrônica de transmissão. Detecção do antígeno glicoproteico nas estruturas internas de <i>P. brasiliensis</i> , isolado 18, através dos anticorpos monoclonais gerados contra a glicoproteína.....	117
<b>Figura 43</b> - Histopatologia dos pulmões dos camundongos BALB/c infectados com Pb01 e tratados com anticorpo monoclonal contra Hsp60 e anticorpo irrelevante, A4, após 15 dias da infecção intratraqueal.....	120
<b>Figura 44</b> - Unidades formadoras de colônias dos pulmões de camundongos BALB/c que receberam 1 mg dos anticorpos monoclonais 7B6 e 4E12 e irrelevante, A4, 15 dias após da infecção com Pb18.....	121
<b>Figura 45</b> - (A) Quantificação de IL-4 e (B) quantificação de IL-10 presentes no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com os anticorpos monoclonais contra Hsp60, 7B6 e 4E12 e AcM irrelevante (A4).....	122
<b>Figura 46</b> - (A) Quantificação de IL-12p40 e (B) quantificação de IL-12p70 presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com os anticorpos monoclonais contra Hsp60, 7B6 e 4E12 e AcM irrelevante (A4).....	123
<b>Figura 47</b> - Quantificação de IFN- $\gamma$ presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com os anticorpos monoclonais contra Hsp60, 7B6 e 4E12 e AcM irrelevante (A4).....	123
<b>Figura 48</b> - Índice de Fagocitose, o ensaio foi realizado utilizando-se a linhagem de macrófagos peritoneal-murino (J774.16), previamente ativados com IFN- $\gamma$ (50 U/ml), frente a leveduras de <i>P. lutzii</i> e 10 e 50 $\mu$ g/ml dos anticorpos monoclonais contra Hsp60, por 12 horas, e o anticorpo irrelevante como controle .....	124
<b>Figura 49</b> – Microscopia eletrônica de transmissão. Detecção do antígeno Hsp60 nas estruturas internas de <i>P. brasiliensis</i> , isolado 18, através dos anticorpos monoclonais gerados contra Hsp60 derivada de <i>H. capsulatum</i> .....	126
<b>Figura 50</b> - Curvas de sobrevivência da larva <i>G. mellonella</i> após infecção com diferentes concentrações de <i>P. lutzii</i> .....	128
<b>Figura 51</b> - Curvas de sobrevivência da larva <i>G. mellonella</i> após infecção com diferentes concentrações de <i>H. capsulatum</i> G184.....	128
<b>Figura 52</b> - Histopatologia da larva <i>G. mellonella</i> , corada pelo método PAS.....	129
<b>Figura 53</b> - Histopatologia da larva <i>G. mellonella</i> , corada pelo método PAS.....	130
<b>Figura 54</b> - Número de estruturas semelhantes a granulomas contendo leveduras de <i>P. lutzii</i> contados nas lâminas de histologia.....	131
<b>Figura 55</b> - <i>G. mellonella</i> infectada com <i>H. capsulatum</i> G184 induz o processo de melanização das larvas de forma dose dependente.....	131



**Figura 56** - *G. mellonella* infectada com *H. capsulatum* G184 induz o processo de melanização das larvas de forma dose dependente.....132

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
µg	micrograma
µl	microlitro
µm	Micrômetro
AcM	Anticorpo monoclonal
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> – infusão de cérebro e coração
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> - soro de albumina bovina
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Etanol
CD	<i>Cluster differentiation</i> - marcador de superfície
CDAP	1-ciano-4-dimetilaminopiridina tetrafluoroborato
CH <sub>3</sub> COOH	ácido acético glacial
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
cm	Centímetro
CMH	Monohexosilceramida
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> – Ensaio imunossorbente ligado à enzima
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
gp	Glicoproteína
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HAT	Hipoxantina, aminopterina, timidina
HCl	Ácido clorídrico

HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> – cromatografoa líquida de alta performance
HPTLC	<i>High-performance thin-layer chromatography</i> – cromatografia em camada delgada de alta performance
Hsp	<i>Heat shock protein</i> – proteína de choque térmico
HT	Hipoxantina, timidina
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
ID	Imunodifusão dupla
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL-4	Inteleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Inteleucina 10
IL-12	Interleucina 12
KCl	Cloreto de potássio
KDa	Quilodalton
kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
kV	Quilovolts
l	Litro
L-DOPA	L-3,4 – dihidroxifenilalanina
m	Metro
M	Molaridade
mcKLH	<i>Mariculture Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro

mm	Milímetro
mM	Milimolar
NaBH <sub>4</sub>	Boroidreto de sódio
NaCO <sub>2</sub>	Carbonato de sódio
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
P10	Peptídeo 10
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> – padrão molecular associado ao patógeno
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> – salina fosfatada tamponada
PCM	Paracoccidioidomicose
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SPF	<i>Specific pathogen free</i> – Condição livre de patógenos
t	Tempo
TGF-β	Fator de crescimento transformante-beta
T <sub>h</sub> 1	Linfócito T <i>helper</i> 1
T <sub>h</sub> 2	Linfócito T <i>helper</i> 2
TLR2	Receptor do tipo toll 2

TLRs	<i>Toll-like receptor</i> – receptor do tipo Toll
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
U	Unidade
UFC	Unidades formadoras de colônia
USP	Universidade de São Paulo
V	Volts
v/v	Volume:volume
$\alpha$ -CMH	alfa-monohecosilceramida

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	41
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
<b>3.1 Composição de carboidratos derivados de diferentes isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i></b> .....	42
3.1.1 Micro-organismos e condições de cultivo.....	42
3.1.2 Preparação das células de diferentes isolados de <i>P. brasiliensis</i> para a extração de carboidratos totais.....	42
3.1.3 Extração alcalina de diferentes isolados de <i>P. brasiliensis</i> .....	42
3.1.4 Análise de monossacarídeos totais de diferentes isolados de <i>P. brasiliensis</i> por cromatografia gasosa (GC).....	43
3.1.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) da amostra extraída por hidrólise alcalina de <i>P. brasiliensis</i> (isolado 18).....	44
3.1.6 Dosagem de proteínas e açúcares totais de <i>P. brasiliensis</i> (isolado 18).....	44
3.1.7 Determinação do potencial zeta da amostra derivada da extração alcalina de <i>P. brasiliensis</i> (isolado 18).....	45
<b>3.2 Cultivo de <i>P. brasiliensis</i> na presença e na ausência de L-DOPA</b> .....	45
3.2.1 Extração e purificação das partículas de melanina.....	45
<b>3.3 Preparação das células de <i>P. brasiliensis</i> para a extração de glicolípido neutro – monohexosilceramida – CMH</b> .....	46
3.3.1. Extração e purificação de CMH de <i>P. brasiliensis</i> .....	46
<b>3.4 Imunização dos animais para produção de anticorpos monoclonais</b> .....	48
3.4.1. Imunização dos camundongos com CMH.....	48
3.4.1.1 <i>Cinética da produção de anticorpos contra CMH</i> .....	49
3.4.2. Imunização dos camundongos com melanina.....	50
3.4.2.1 <i>Cinética da produção de anticorpos contra melanina</i> .....	51
3.4.3 Imunização dos camundongos com antígeno glicoproteico obtido por hidrólise alcalina de <i>P. brasiliensis</i> , isolado 18.....	52
3.4.3.1 <i>Cinética da produção de anticorpos contra antígeno de natureza polissacarídica</i> .....	54
3.4.3.2 <i>Conjugação da glicoproteína, derivada de Pb18, à proteína de BSA e sua purificação</i> .....	54
<b>3.5 Preparação de monocamada de macrófagos primários, feeder layer, para utilização na técnica de fusão</b> .....	56
3.5.1 Seleção das células de mieloma.....	56
3.5.2 Obtenção de anticorpos monoclonais contra CMH.....	56
3.5.2.1 <i>Clonagem dos hibridomas secretores de anticorpos contra CMH</i> .....	57
3.5.2.2 <i>Expansão dos hibridomas secretores de anticorpos contra CMH</i> .....	58
3.5.2.3 <i>Obtenção de imunoglobulinas de sobrenadante de cultura de hibridoma específicos para CMH</i> .....	58

3.5.2.4 Purificação em membrana de PVDF (Polyvinylidene Fluoride) dos anticorpos anti-CMH presentes no sobrenadante de cultura de hibridomas.....	58
3.5.2.5 SDS-PAGE.....	58
3.5.3 Obtenção de anticorpos monoclonais contra melanina.....	59
3.5.4 Obtenção de anticorpos monoclonais contra antígeno de natureza glicoprotéica derivado de <i>P. brasiliensis</i> .....	61
<b>3.6 Ensaio <i>in vitro</i> da atividade de anticorpos mono-específicos gerados contra monohexosilceramida extraída de <i>P. brasiliensis</i>.....</b>	<b>60</b>
3.6.1 Ensaio de fagocitose.....	60
3.6.1.1 Índice de fagocitose.....	61
3.6.2 Ensaio de viabilidade celular.....	61
3.6.3 Determinação da liberação de óxido nítrico (NO).....	61
3.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão.....	62
<b>3.7 Ensaio <i>in vitro</i> da atividade de anticorpos policlonais gerados contra melanina extraída de <i>P. brasiliensis</i>.....</b>	<b>63</b>
3.7.1 Ensaio de fagocitose.....	63
3.7.2 Ensaio de viabilidade celular.....	63
<b>3.8 Ensaio <i>in vivo</i> da atividade de anticorpos monoclonais contra CMH derivado de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> na infecção experimental por <i>P. brasiliensis</i>.....</b>	<b>63</b>
3.8.1 Expansão do Anticorpo monoclonal $\alpha$ -CMH.....	63
3.8.1.1 Animais utilizados.....	64
3.8.1.2 Preparação do inóculo.....	64
3.8.1.3 Infecção Intratraqueal.....	64
3.8.1.4 Histopatologia.....	65
3.8.1.5 Determinação da carga fúngica nos pulmões.....	65
3.8.1.6 Detecção e quantificação de citocinas.....	65
<b>3.9 Ensaio <i>in vitro</i> da atividade de anticorpos monoclonais contra CMH derivado de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> na infecção experimental por <i>P. brasiliensis</i>.....</b>	<b>66</b>
3.9.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	66
<b>3.10 Avaliação da atividade de anticorpos monoclonais gerados contra Hsp60 derivada de <i>Histoplasma capsulatum</i> na infecção experimental por <i>P. lutzii</i>....</b>	<b>66</b>
3.10.1 Animais utilizados.....	66
3.10.2 Preparação do inóculo.....	66
3.10.3 Infecção Intratraqueal.....	67
3.10.4 Histopatologia.....	67
3.10.5 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).....	67
3.10.6 Detecção e quantificação de citocinas.....	67
<b>3.11 Avaliação da atividade <i>in vitro</i> de anticorpos monoclonais gerados contra Hsp60 derivada de <i>Histoplasma capsulatum</i> na infecção experimental por <i>P. lutzii</i>.....</b>	<b>67</b>

3.11.1 Fagocitose.....	67
<b>3.12 Uso de hospedeiro inveterbrado, <i>Galleria mellonella</i>, como alternativa no uso de animais de experimentação.....</b>	<b>68</b>
3.12.1 Espécies e condições de cultivo.....	68
3.12.2 Infecção.....	68
3.12.3 Histopatológico.....	68
3.12.4 Determinação da carga fúngica em <i>G. mellonella</i> .....	69
<b>3.13 Análise estatística.....</b>	<b>69</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
<b>4.1 Análise de monossacarídeos totais de diferentes isolados de <i>P. brasiliensis</i> por cromatografia gasosa (GC).....</b>	<b>70</b>
<b>4.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) da amostra extraída por hidrólise alcalina de <i>P. brasiliensis</i> (isolado 18).....</b>	<b>70</b>
<b>4.3 Dosagem de proteínas e açúcares totais de <i>P. brasiliensis</i> (isolado 18).....</b>	<b>72</b>
<b>4.4 Determinação do potencial zeta da amostra derivada da extração alcalina de <i>P. brasiliensis</i> (isolado 18).....</b>	<b>72</b>
<b>4.5 Cultivo de <i>P. brasiliensis</i> na presença e na ausência de L-DOPA.....</b>	<b>74</b>
4.5.1 Extração e purificação das partículas de melanina.....	75
<b>4.6 Preparação das células de <i>P. brasiliensis</i> para a extração de glicolípido bruto.....</b>	<b>76</b>
4.6.1 Extração de glicolípido neutro (monohexosilceramida - CMH) de <i>P. brasiliensis</i> .....	77
<b>4.7 Imunização dos camundongos com CMH.....</b>	<b>78</b>
<b>4.8 Imunização dos camundongos com melanina.....</b>	<b>80</b>
<b>4.9 Imunização dos camundongos com antígeno glicoproteico extraído de <i>P. brasiliensis</i> (isolado 18).....</b>	<b>82</b>
4.9.1 Conjugação do antígeno glicoproteico derivado da extração alcalina de <i>P. brasiliensis</i> (isolado 18), à proteína de BSA e sua purificação.....	85
<b>4.10 Produção de anticorpos monoclonais contra CMH.....</b>	<b>88</b>
4.10.1 Obtenção de imunoglobulinas de sobrenadante de cultura de hibridomas específicos para CMH.....	91
4.10.2 SDS-PAGE.....	91
<b>4.11 Obtenção de anticorpos monoclonais contra melanina.....</b>	<b>92</b>
<b>4.12 Obtenção de anticorpos monoclonais contra antígeno de natureza glicoproteica derivado da extração alcalina de <i>P. brasiliensis</i>.....</b>	<b>94</b>
<b>4.13 Ensaio <i>in vitro</i> da atividade de anticorpos monoespecíficos gerados contra monohexosilceramida extraída de <i>P. brasiliensis</i>.....</b>	<b>95</b>
4.13.1 Ensaio de fagocitose.....	95
4.13.2 Ensaio de viabilidade celular.....	97
4.13.3 Determinação da liberação de óxido nítrico (NO).....	98
4.13.4 Microscopia eletrônica de transmissão.....	99



<b>4.14 Ensaio <i>in vitro</i> da atividade de anticorpos policlonais gerados contra melanina extraída de <i>P. brasiliensis</i>.....</b>	<b>101</b>
<b>4.15 Ensaio de viabilidade celular.....</b>	<b>102</b>
<b>4.16 Ensaio <i>in vivo</i> da atividade de anticorpos monoclonais contra CMH derivado de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> na infecção experimental por <i>P. brasiliensis</i>.....</b>	<b>103</b>
4.16.1 Histopatologia.....	103
4.16.2 Determinação da carga fúngica nos pulmões.....	107
4.16.3 Detecção e quantificação das citocinas IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ .....	108
<b>4.17 Ensaio <i>in vitro</i> da atividade de anticorpos monoclonais contra CMH derivado de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> na infecção experimental por <i>P. brasiliensis</i>.....</b>	<b>114</b>
4.17.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	114
<b>4.18 Ensaio <i>in vitro</i> dos anticorpos monoclonais gerados contra glicoproteína derivada da extração alcalina de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....</b>	<b>117</b>
4.18.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	116
<b>4.19 Avaliação da atividade de anticorpos monoclonais gerados contra Hsp60 derivada de <i>Histoplasma capsulatum</i> na infecção experimental por <i>P. lutzii</i>.....</b>	<b>119</b>
4.19.1 Histopatologia.....	119
4.19.2 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).....	121
4.19.3 Detecção e quantificação de citocinas IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, e IFN- $\gamma$ .....	121
<b>4.20 Avaliação da atividade <i>in vitro</i> de anticorpos monoclonais gerados contra Hsp60 derivada de <i>Histoplasma capsulatum</i> na infecção experimental por <i>P. lutzii</i>.....</b>	<b>124</b>
4.20.1 Fagocitose.....	124
4.20.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	125
<b>4.21 Uso de hospedeiro inveterbrado <i>Galleria mellonella</i> como alternativa no uso de cobaias de experimentação.....</b>	<b>127</b>
4.21.1 Histopatológico.....	129
4.21.2 Determinação da carga fúngica em <i>G. mellonella</i> .....	132
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>133</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>145</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>146</b>
<b>APÊNDICE A - Artigo de Periódico.....</b>	<b>163</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica de caráter granulomatoso. Foi identificado pela primeira vez em lesões bucais de pacientes por Adolfo Lutz, no Brasil em 1908. Posteriormente em 1912, Alfonso Splendore contribuiu para os estudos da morfobiologia do fungo e o classificou pela primeira vez dentro do gênero *Zymonema*, propondo a denominação *Z. brasiliensis*. No entanto, a classificação definitiva, feita por Floriano Paulo de Almeida, somente foi criada em 1930, após verificar indiscutíveis e notáveis diferenças entre o granuloma coccidióico, causado pelo fungo *Coccidioides immitis*, dos Estados Unidos e granuloma da PCM, do Brasil. Após essa diferenciação, foi criado o gênero *Paracoccidioides* e revalidada a espécie *brasiliensis* (1).

Estudos de variabilidade genética dos isolados de *P. brasiliensis*, utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares, mostraram alta variabilidade genética deste fungo, revelando três espécies filogenéticas distintas, PS2, agrupando isolados provenientes do Brasil e Venezuela, PS3, formado por somente isolados da Colômbia e S1, com distribuição no Brasil, Argentina, Peru, Paraguai e Venezuela (2).

Em 2009, Teixeira e outros (3) propuseram a criação de uma nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides*, *P. lutzii*, em homenagem ao descobridor Adolfo Lutz. De acordo com o critério do método de reconhecimento de espécies filogenéticas pela concordância genealógica, os autores analisaram 88 amostras e identificaram 16 isolados altamente divergentes dos grupos previamente apresentados PS2, PS3 e S1, sugerindo dessa forma uma nova criação filogenética, “Pb01-like”.

Análises morfológicas também excluíram Pb01 dos demais clados e a resposta terapêutica de pacientes infectados com esse isolado foi melhor quando tratados com sulfametoxazol-trimetoprim (4). Esses dados corroboram para a criação da nova espécie.

*P. brasiliensis* – isolado 18 - mais comumente empregado nos estudos no Estado de São Paulo está agrupado geneticamente no grupo S1.

O fungo apresenta termodimorfismo, ou seja, desenvolve-se na forma de bolor à temperatura ambiente entre 19 – 25 °C, e em temperaturas de 35 – 37 °C,

apresenta a forma de levedura unicelular. A transição de bolor para levedura é de especial interesse, uma vez que esta conversão é considerada um fator de patogenicidade dos fungos dimórficos (5).

Decorridos mais de 100 anos da descoberta de *P. brasiliensis* e até a presente data, não é possível afirmar qual seria seu habitat. Estudos referentes à ecologia do fungo sugerem que este pode ser encontrado em solo rico em matéria orgânica e em ambientes com variações mínimas de temperatura (1).

O fungo foi isolado em solos do Estado do Ceará (6), em cafezais do Estado de Minas Gerais (7), na Argentina (8), na Venezuela (9) e até em ração para cachorros (10).

*P. brasiliensis* também foi isolado de tecidos e excrementos de animais diversos, como do morcego frugífero *Artibeus lituratus*, de pingüim *Pygoscelis adeliae* e diversas vezes do tatu da espécie *Dasypus novemcinctus* (11-15). Estudos mostram que *D. novemcinctus* pode representar o hospedeiro silvestre de *P. brasiliensis*, pois foi observada correlação positiva entre os índices de infecção micótica e as regiões que abrigam esses tatus. Além disso, Vergara e Martinez mostraram a presença de granulomas, contendo células leveduriformes de *P. brasiliensis*, no baço e pulmão desses animais, indicando que os mesmos não são apenas reservatórios, como também podem ser acometidos pela doença (14).

Johnson e Lang em 1977 encontraram lesões granulomatosas no fígado e cólon do macaco de cheiro, *Saimiri sciureus*, contendo diversos micro-organismos de múltiplos brotamentos, sugerindo a presença de *P. brasiliensis*, no entanto, o agente etiológico não foi isolado (16).

Em síntese, todos os esforços voltados à definição do nicho ecológico de *P. brasiliensis* apontam que o solo possivelmente é seu habitat natural.

A forma de bolor, possivelmente encontrada em seu habitat natural, é considerada a forma infectante para o homem. A principal via de entrada de *P. brasiliensis* é pelo trato respiratório, através da inalação de propágulos da fase miceliana. Restrepo e outros (17) relataram que o tamanho dos conídios é de 3,5 µm a 5 µm, tamanho favorável para a instalação do micro-organismo nos alvéolos pulmonares. Após a penetração no hospedeiro, os conídios convertem-se para a forma de levedura devido à temperatura do hospedeiro que é em média de 36,5 °C, sendo esta transformação necessária para o estabelecimento da infecção (18, 19).

O diagnóstico dessa micose sistêmica fundamenta-se no encontro de elementos fúngicos sugestivos de *P. brasiliensis* em exame micológico direto “a fresco” de amostras como escarro, raspado de lesão, aspirado de linfonodo, fragmento de biópsia e/ou cultivo do fungo em meios de cultura específicos e/ou exame histopatológico. Provas sorológicas auxiliam no diagnóstico e servem para avaliar a resposta do hospedeiro ao tratamento específico. A técnica sorológica mais rotineiramente empregada é a imunodifusão dupla (ID) em gel ágar, com o antígeno de maior reconhecimento entre os pacientes, a gp43. O título de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* tem correlação com a gravidade das formas clínicas. É recomendado que seja feita a titulação dos soros na ID para melhor interpretação dos resultados, haja visto que os títulos de anticorpos diminuem progressivamente com o controle clínico da doença. Reações falso-positivas podem ocorrer com soros de pacientes infectados com *Aspergillus* sp e *H. capsulatum*. Outros métodos são empregados, mas apenas em centros de referência e de pesquisas, como o ELISA, porém com menor especificidade que a ID (20).

A PCM tem sido observada em todas as faixas etárias, com predominância entre os 30 e os 50 anos de idade. Até a puberdade, a incidência da moléstia é igual para ambos os sexos; contudo na idade adulta, mais de 80% dos pacientes são do sexo masculino. A maior resistência das mulheres à infecção é dada pelos estrógenos (1). O hormônio feminino 17- $\beta$ -estradiol inibe a transformação da forma de micélio para levedura, influenciando na patogenicidade do fungo (21).

A capacidade patogênica desse fungo é relacionada não somente à transição de suas fases, mas também pautada na síntese e secreção de determinadas moléculas, na estrutura da fase leveduriforme e, entre outros fatores.

*P. brasiliensis* apresenta uma estrutura complexa de polipeptídeos, proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos e lipídeos que reúnem condições físico-químicas e biológicas para atuarem como antígenos.

Há um interesse particular na parede da célula do fungo, pelo fato dela ser responsável pela manutenção, forma, estabilidade celular e pelos processos metabólicos do fungo, sendo, portanto, um alvo em potencial para ação das drogas antifúngicas.

O reconhecimento do micro-organismo pela célula hospedeira depende de processos multifatoriais, com a participação de vários componentes presentes na parede celular e a interação com seus receptores na célula hospedeira.

Kanetsuna e outros (22, 23) indicaram que a parede celular de *P. brasiliensis* é constituída por polissacarídeos, particularmente  $\alpha$  e  $\beta$  – 1,3-glucana. A  $\alpha$  – 1,3-glucana é exclusiva na fase de levedura e a  $\beta$  – 1,3-glucana está presente na fase de bolor. Além destas, encontra-se também a galactomana, um componente imunogênico presente em maior proporção na fase de bolor e glucosaminas e glicoproteínas, predominantes na fase de levedura. Polissacarídeos da parede celular de *P. brasiliensis* têm papel importante nas interações hospedeiro-fungo. Segundo San-Blas e San-Blas, a existência, na parede celular, de uma  $\alpha$  - 1,3-glucana está relacionada à virulência de *P. brasiliensis*, bem como a existência de outras moléculas relacionadas à patogenicidade do fungo (24).

Podemos destacar inúmeras atividades biológicas para glucanas derivadas de fungos, que são conhecidas como modificadores da resposta biológica. Glucanas de *Sacharomyces cerevisiae* são conhecidas como potentes ativadoras de monócitos e neutrófilos do sangue, contribuindo desta forma para maior eficiência do sistema imune no combate a infecções (25).

Por apresentar esse papel, as glucanas têm sido alvo de inúmeras investigações. Uma  $\alpha$ -glucana extraída de *Pseudallescheria boydii* demonstrou capacidade em aumentar a fagocitose dos conídios, de forma dose dependente. Quando a  $\alpha$ -glucana foi removida enzimaticamente dos conídios, o índice de fagocitose foi significativamente reduzido, indicando um papel essencial da glucana durante o processo de internalização pelos macrófagos. No mesmo trabalho, os autores demonstraram que  $\alpha$ -glucana induz secreção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos e pelas células dendríticas, através do mecanismo envolvendo receptores *Toll-like* 2, CD14 e Myd88. A secreção das citocinas IL-12 e TNF- $\alpha$  sugere um possível mecanismo protetor, que polariza a resposta imune para  $T_H1$  durante a infecção por *P. boydii* (26).

Receptores do tipo *Toll* são uma família de proteínas transmembrânicas que fazem parte do sistema imunológico inato. Foram descobertos em estudos com a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, e são responsáveis pelo reconhecimento de vários padrões moleculares associados a patógenos – PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Os monócitos, macrófagos e neutrófilos fagocitam os patógenos microbianos e estimulam a resposta via liberação de citocinas, que resulta no desenvolvimento da imunidade inata, adaptativa, bem como a resposta inflamatória. Estudos com vários receptores *Toll-like* (TLRs) demonstram que essas

proteínas transmembrânicas podem ativar a vias de sinalização celular que regulam a expressão de citocinas, através da indução de várias moléculas. Alguns trabalhos demonstram que TLR2 reconhece partículas de zimosan, presente em uma gama de fungos. (27, 28).

Beta-glucanas são compostos essenciais da parede celular de patógenos fúngicos e possuem um papel crítico na viabilidade celular. Compostos que inibem sua síntese exibem atividade antifúngica (29). Anticorpos monoclonais (AcM) contra  $\beta$ -glucanas têm mostrado proteção contra infecções causadas por *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* (30, 31). O anticorpo monoclonal, de isotipo IgG2b, ligou-se aos conídios de *A. fumigatus* eficientemente, inibindo seu crescimento para forma de hifas, impedindo dessa forma a colonização do tecido. Portanto, especula-se que anticorpos anti- $\beta$ -glucanas podem ser usados terapeuticamente contra um amplo espectro de fungos que exibem  $\beta$ -glucanas em sua parede celular (31).

Em modelo de cryptococose experimental, demonstrou-se que anticorpos contra  $\beta$ -glucana reconheceram células de *Cryptococcus neoformans* capsuladas e acapsuladas, inibiram *in vitro* e *in vivo* o crescimento celular fúngico, reduziram o tamanho da cápsula de dois isolados capsulados e, auxiliaram na opsonização de células acapsuladas, mas não de capsuladas, em macrófagos peritoneais murinos e em monócitos humanos. Além disso, conferiram relativa proteção em camundongos imunocompetentes e em camundongos neutropênicos infectados com a levedura patogênica (32).

Anjos e outros (33) investigaram o efeito de uma fração extraída de *P. brasiliensis*, cujo composto principal e ativo é a  $\beta$ -glucana, no processo de ativação de monócitos humanos que resulta na atividade fungicida dessas células. Essa fração extraída aumentou a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), derivado do estresse oxidativo, pelas células. No entanto, esse aumento não foi associado com atividade fungicida. Entretanto, quando os monócitos foram incubados com a fração mais IFN- $\gamma$ , foi detectada ação antifúngica e estímulo da secreção de TNF- $\alpha$ , com consequente morte da levedura de *P. brasiliensis*.

Funções imunomoduladoras das beta-glucanas são descritas também em modelo suíno. Xiao e outros (34) mostraram que monócitos do sangue periférico de porcos infectados com vírus da síndrome respiratória e reprodutiva, estimulados *in vitro* com  $\beta$ -glucana, aumentou a secreção de IFN- $\gamma$ , a qual representa atividade antiviral.

Com relação a outros fatores envolvidos na patogenicidade de *P. brasiliensis*, é sugerida a presença da melanina, pigmento de coloração marrom escuro ou preto, formada pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou indólicos. Ela é caracterizada por polímeros multifuncionais presentes em diversas espécies em vários reinos. Estes polímeros estão presentes em toda a célula ou na parede celular (35, 36).

A síntese de melanina está também associada à virulência para alguns fungos patogênicos como *Fonsecaea pedrosoi* (37), *Sporothrix schenckii* (38), *Histoplasma capsulatum* (39), *Coccidioides posadasii* (40), *Blastomyces dermatitidis* (41) e *A. fumigatus* (42).

Gómez e outros (43) demonstraram que *P. brasiliensis* é capaz de sintetizar melanina *in vitro* e durante a infecção. Cultivado em meio líquido suplementado com L-Dopa, o fungo produziu um pigmento escuro estruturalmente semelhante àquele que havia sido isolado da melanização de *Cryptococcus neoformans*.

Foi evidenciado por Kwon-Chung e Rhodes (44) que *C. neoformans* produtores de melanina são mais virulentos que os mutantes não produtores de melanina, sugerindo que leveduras melanizadas são resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Para corroborar a afirmação de que a melanina está integrada à virulência presente em alguns fungos patogênicos, Da Silva e outros (45) evidenciaram, em leveduras melanizadas de *P. brasiliensis*, um aumento na resistência aos mecanismos de atividade antifúngica dos macrófagos e ainda foi verificado que as leveduras são menos susceptíveis às drogas cetoconazol, fluconazol, itraconazol, sulfametoxazol e anfotericina B.

Outros fatores de virulência que têm se destacado são os glicolipídeos, os quais estão envolvidos em várias funções como crescimento, adesão, mediadores de reconhecimento, diferenciação celular, modulador na transdução de sinais, regulador da proliferação celular e têm sido muito estudados em mamíferos, no entanto, sabe-se pouco sobre suas funções, bem como suas localizações intracelulares nos fungos (46).

Mono-hexosilceramidas (CMH), glicoesfingolipídios compostos de uma ceramida ligada a um único açúcar, tem sido amplamente detectada em células fúngicas (47). Foram caracterizadas em extratos lipídicos de uma gama de espécies fúngicas como, por exemplo, *Paracoccidioides brasiliensis* (48, 49). O grupo verificou a presença de CMH na fração de lipídeos, presente nas formas de levedura e bolor

de *P. brasiliensis*, e demonstrou que CMH de *P. brasiliensis* é uma glucosilceramida, no entanto com estrutura distinta das glucosilceramidas de mamíferos e de outros fungos.

CMH também está associada ao crescimento fúngico, conforme reportado por Rodrigues e outros (50), no qual demonstraram em *C. neoformans* que anticorpos contra essas moléculas previnem o início do desenvolvimento celular e o crescimento do fungo *in vitro*. A inibição da glucosilceramida sintase, enzima responsável pela fase final da síntese de CMH, bloqueia a germinação e o crescimento de hifas de *A. fumigatus* e de *A. nidulans* (51).

Conídios de *F. pedrosoi* foram tratados com anticorpos contra CMH e seu crescimento foi inibido substancialmente. E ainda, estes anticorpos auxiliaram na opsonização, internalização e eliminação do fungo (52).

Pinto e outros (53) revelaram que CMH de *Pseudallescheria boydii* são antígenos reconhecidos pelo soro hiperimune de coelhos infectados com esse fungo e observaram ainda que anticorpos contra CMH influenciam na formação de tubos germinativos tanto em *P. boydii* quanto em *C. albicans*, indicando o envolvimento dessa molécula na diferenciação e o conseqüente papel na infectividade da célula fúngica.

As diferenças nas estruturas dos CMHs são de grande interesse para auxiliar no esclarecimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o fungo, bem como o papel desses glicoconjugados na patogenia, virulência e resposta imune, visando o estabelecimento de novos alvos para a terapia e o diagnóstico da PCM.

Silva (54) produziu extrato lipídico bruto a partir de *P. brasiliensis* e detectou *in vivo* a produção de anticorpos, e estes reconheceram lipídios bioativos, como CMH e glicosfingolipídeos acídicos, através de ELISA e HPTLC-*immunostaining*. Ainda neste trabalho, leveduras opsonizadas com soro inativado de camundongos imunizados com extrato lipídico bruto foram internalizadas com mais eficiência pelos macrófagos. Bertini e outros (55) demonstraram que soro de pacientes reconhece resíduos de galactofuranose dos glicosfingolipídeos acídicos. Os soros de pacientes apresentam altos títulos contra estes resíduos, antes da terapia, decaindo após cinco meses de tratamento, indicando uma potencial aplicação deste antígeno no estudo da resposta imune de pacientes com PCM.

Dentre os glicoconjugados de importância para *P. brasiliensis* podemos destacar, pelo seu significado imunológico, a glicoproteína de 43 kDa (gp43), a qual



possui papel imunogênico (56, 57). É o principal antígeno utilizado para o diagnóstico da PCM e quase todos os soros de pacientes reconhecem essa molécula (58).

Foi investigado, na seqüência da gp43, um epítipo de 15 aminoácidos, responsável pela reatividade imunológica, denominado de peptídeo 10 (P10), o qual é reconhecido pelos linfócitos T CD4+ (59). Taborda e outros (58) demonstraram que a imunização com gp43 e P10 leva à proteção contra *P. brasiliensis in vivo*.

Há outras propostas de funções biológicas para a gp43, sendo caracterizada como uma proteína implicada na patogenicidade do fungo (60, 61), entretanto, até o presente momento, busca-se melhores esclarecimentos sobre a real função desta glicoproteína.

Vicentini e outros (60) demonstraram a capacidade da gp43 de ligar-se a elementos da matriz extracelular, como a laminina, explicando desta forma sua participação no processo de adesão de células leveduriformes a células epiteliais, com conseqüente invasão e destruição dos tecidos no hospedeiro. Mendes-Giannini e outros (62) também mostraram que a gp43 liga-se a fibronectina e laminina da matriz extracelular, contudo a adesão não representa o único fator que promove o desenvolvimento da infecção. Essa disseminação pode ser auxiliada pelos receptores manose-fucose para macrófagos presentes na gp43, conforme apresentado por Almeida e outros (63). Anticorpos monoclonais (AcM) dirigidos contra a gp43 foram obtidos por Puccia & Travassos (64) e caracterizados por Gesztesí e outros (65), alguns dos AcM foram capazes de modular a adesão e patogenicidade fúngica dependente de laminina. A adesão do micro-organismo nas células epiteliais representam um passo importante no processo de infecção, mas há outras moléculas implicadas nesse processo tais como as proteínas de 19, 30, 32 kDa, bem como a gliceraldeído-3-fosfatase desidrogenase (66, 67)

Outra função da gp43 na interação fungo-macrófago foi demonstrada por Popi e outros (68), indicando que a mesma diminui de maneira dose dependente tanto a fagocitose do *P. brasiliensis*, quanto de partículas de zimosan (partículas revestidas por manose), inibindo a ação efetiva dos macrófagos, o que sugere que a gp43 pode estar envolvida nos mecanismos de evasão do fungo.

Hanna e outros (69) verificaram que na presença de anticorpos contra gp43, a aderência de *P. brasiliensis* às células epiteliais do hospedeiro é substancialmente reduzida, indicando que esta glicoproteína age como uma adesina. Outros

componentes como a fibronectina e colágenos podem estar envolvidos também na adesão do fungo.

Outra glicoproteína expressa e secretada pelo *P. brasiliensis* é a gp70 (70), possuindo 96% de reconhecimento nos soros de pacientes com paracoccidioidomicose. Ambas as glicoproteínas 43 e 70 induzem resposta de linfoproliferação (71).

Mattos-Grosso e outros (72) utilizaram um anticorpo monoclonal, contra a gp70, na investigação da patogênese de *P. brasiliensis*, exibindo inibição da fagocitose de partículas de zimosan. Esta inibição pode ser explicada pela porção polissacarídica da gp70, cujos componentes ligam-se aos receptores de manose expressos pelos macrófagos.

A diversidade de moléculas bioativas encontradas em micro-organismos, como por exemplo, fungos dimórficos é extensa. Todavia há uma diversidade dessas moléculas sendo estudadas, entre elas podemos destacar as proteínas de choque térmico, Hsp (*Heat shock protein*), as quais contribuem para a proteção e reparo de danos celulares promovidos pelo estresse e estão associadas a termo-adaptação dos fungos dimórficos (73, 74).

As famílias das proteínas Hsp têm sido foco de muitos estudos, envolvendo vacinas profiláticas, marcadores de diagnóstico para doenças inflamatórias e agentes imunomoduladores em doenças autoimunes (75-77).

As Hsp60 dos micro-organismos patogênicos tais como *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium tuberculosis* e *M. leprae* são consideradas imunogênicas (78-80).

Vacinas de DNA expressando Hsp60 associadas a IFN- $\gamma$ , em modelo animal infectados com *Y. enterocolitica* promoveram, o recrutamento de células do sistema imune humoral e celular e reduziram a carga bacteriana esplênica nos camundongos (81).

Em modelos fúngicos tais como histoplasose, a proteína recombinante Hsp60 conferiu proteção em camundongos infectados com a levedura (82). Cain e Deep (83) mostraram que a resolução da doença fúngica causada por *H. capsulatum* ocorreu pela liberação de citocinas e proliferação de células T. O papel protetor, com seus mecanismos celulares e moleculares, atribuídos a Hsp60 em histoplasose têm sido investigado em vacinas profiláticas (84).

Em 2008 (85), foi demonstrado que vacinas de DNA expressando Hsp60 exibem proteção na infecção experimental por *P. brasiliensis*, reduzindo a carga fúngica nos

órgãos de tropismo do fungo, e mais ainda, seu papel protetor foi atribuído ao aumento vigoroso na liberação das citocinas de perfil  $T_H1$ , tais como IFN- $\gamma$  e IL-12.

Além do papel protetor exibido pela Hsp60, Cunha e outros (86) detectaram 96% de reconhecimento dessa proteína em amostras de soros de pacientes com PCM, apontando para um possível uso dessa molécula para diagnóstico.

O controle da infecção depende do tipo de resposta imune desenvolvida pelo paciente, a resposta celular,  $T_H1$ , está relacionada a uma resposta efetiva e protetora, ao contrário da resposta humoral,  $T_H2$ , a qual acarreta numa maior gravidade da doença.

A caracterização da resposta induzida pelo *P. brasiliensis* ocorre pela formação de granuloma epitelióide, a qual está relacionada à prevenção da disseminação do fungo. A resposta do hospedeiro é a formação de um processo inflamatório granulomatoso crônico, que leva à fibrose. Há um aumento na produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , cuja ação induz o acúmulo de colágeno e esse fato, adicionado à fibrose, podem levar a alterações anatômicas e funcionais dos órgãos, em especial ao pulmão (20). Em pacientes com a forma menos severa, o granuloma é compacto e associado ao baixo número de células fúngicas. Já na PCM aguda, forma agressiva da doença, estudos histopatológicos mostraram a presença de um processo inflamatório inespecífico e as lesões tornam-se difusas com granulomas frouxos, mal organizados, contendo ainda numerosos fungos viáveis em seu interior (87).

Inicialmente acreditava-se que a resposta imune humoral não conduzia a um papel de defesa nos pacientes com PCM aguda, bem como em camundongos suscetíveis, devido a grande quantidade de anticorpos que persistiam na progressão da doença, sugerindo um papel não protetor (71, 88). No entanto estudos mais profundos demonstram que a proteção mediada por anticorpos depende de vários fatores como isotipo, especificidade do epítipo, avidéz, quantidade administrada, assim como a via de inoculação do anticorpo monoclonal, virulência do patógeno, suscetibilidade do hospedeiro. Fatores que revelam uma complexidade entre hospedeiro-patógeno (89, 90)

Em corroboração para esse desequilíbrio da resposta imune associada à PCM, é demonstrado em pacientes infectados, hipergamaglobulinemia, ou seja, altos níveis de anticorpos contra Pb de isotipos IgG1, IgA, e na forma aguda-sub aguda podemos ainda incluir IgG4 e IgE (91, 92).

Buissa Filho e outros (93) avaliaram a administração terapêutica de anticorpos monoclonais contra a gp43 de isotipos IgG2a e IgG2b e demonstraram que estes anticorpos foram capazes de reduzir a carga fúngica nos pulmões de camundongos infectados com *P. brasiliensis*, porém, foi verificada a existência de anticorpos de ambos isotipos não protetores. Constatou-se ainda que os anticorpos monoclonais envolvidos na redução de células fúngicas estavam relacionados ao aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-12 e os não protetores à elevada produção de IL-10, sugerindo assim a desmistificação de trabalhos que relatam terem os anticorpos apenas ação deletéria na PCM. O grupo hipotetizou que a proteção mediada pelos anticorpos monoclonais contra a gp43 deve-se à similaridade molecular entre a gp43 e  $\beta$ -glucanase presente na parede do fungo, favorecendo a opsonização deste anticorpo na superfície da levedura e aumentando a fagocitose e morte intracelular do fungo.

Estudos utilizando camundongos susceptíveis e resistentes a *P. brasiliensis*, B10.A e A/J, respectivamente, mostraram uma tendência de resposta imune T<sub>h</sub>2 em camundongos da linhagem B10.A com lesões granulomatosas não organizadas, contendo diversas células fúngicas viáveis, uma maior secreção dos anticorpos de isotipos IgA e IgG2b, baixa produção de IFN- $\gamma$ , altos níveis de IL-5 e IL-10, ativação policlinal de células B, eosinofilia e acionamento tardio dos macrófagos, levando a uma progressão da doença. Já na linhagem de camundongos A/J ocorreu o inverso com predomínio de resposta T<sub>h</sub>1, controle da multiplicação fúngica em diversos órgãos, formação de um granuloma bem organizado, secreção de anticorpos de isotipo IgG2a, ativação precoce de macrófagos e resolução da infecção (94).

A presença de anticorpos específicos em preparações de soros policlonais corresponde a uma pequena porção do total de imunoglobulinas, e diferenças na quantidade de anticorpos, na especificidade e no isotipo podem explicar porque estas preparações nem sempre conferem proteção (95). Entretanto, existem evidências que a administração de anticorpos monoclonais protetores podem tanto modificar o curso da infecção em camundongos contra certos fungos patogênicos como prevenir a doença, sendo benéficos para o hospedeiro (96, 97).

*C. neoformans*, possui uma cápsula polissacarídica que é essencial para a virulência e anticorpos monoclonais que reagem contra esta cápsula protegem contra a criptococose experimental (97). O envolvimento do isotipo nesta proteção foi avaliado primeiramente quando se observou que anticorpos monoclonais IgG1 eram protetores em vários modelos de infecção contra *C. neoformans* por

prolongarem a vida dos animais infectados (96). Já os AcMs IgG3 foram considerados não protetores, até serem convertidos por *switching* de isótopos em IgG1 quando passaram a ser protetores (98, 99). Já os anticorpos monoclonais de isotipos IgM, IgG2a, IgG2b e IgA conferiram proteção (97, 100).

Ainda no modelo de criptococose experimental, Rosas e outros (101) exibiram eficácia dos anticorpos monoclonais contra melanina na proteção da infecção.

Em *C. albicans*, anticorpos contra polissacarídeos da parede celular são protetores na candidíase experimental disseminada (102, 103). A eficiência desta proteção é dependente da especificidade do epítipo (104). Estes estudos revelam a complexa relação entre a eficácia da proteção mediada por anticorpos com a especificidade do epítipo e o isotipo do anticorpo monoclonal, mas as razões biológicas envolvidas nestas interações permanecem obscuras.

Os mecanismos pelos quais os anticorpos específicos medeiam à proteção contra fungos não são bem compreendidos. Estas moléculas podem mediar à proteção pelo aumento da eficácia de células efetoras do hospedeiro contra o fungo. Anticorpos específicos podem melhorar a resposta inflamatória por promover a fagocitose e, conseqüentemente, aumentar a apresentação de antígenos e a expressão de moléculas co-estimulatórias, ou através do *crosslinking* de receptores para Fc e modulação da produção de citocinas (105-107).

Anticorpos específicos podem aumentar a eficácia da resposta inflamatória contra infecção pulmonar de *C. neoformans* por alterar a razão de citocinas associadas a  $T_h1$ - $T_h2$  (108). Em *C. albicans*, anticorpos contra polissacarídeos da parede celular facilitam a deposição de complemento na parede do fungo, permitindo assim o aumento da fagocitose (109). E em *A. fumigatus* a proteção mediada por anticorpo não foi bem elucidada, e sugere-se que anticorpos que neutralizem proteases ou toxinas podem ser benéficos ao hospedeiro.

Segundo Casadevall (95) há muitas controvérsias sobre o papel dos anticorpos em infecções fúngicas e consta da literatura inúmeros estudos que suportam e denegam seu papel protetor. No entanto, faz-se necessário melhor compreensão sobre suas funções biológicas, para que se possa identificar os anticorpos protetores assim como definir seus antígenos, sua utilização terapêutica e sua contribuição para patogênese das doenças.

Terapias dos mais diversos tipos, usando moléculas bioativas têm sido propostas, já que a cura espontânea não ocorre em pacientes com PCM e o uso por

longos períodos de antifúngicos torna-se tóxico aos pacientes, haja vista que seu tratamento exige uma terapia prolongada para se obter um resultado bem sucedido. Para se evitar uma recaída da doença, a terapia é mantida por anos e, mesmo sob um tratamento bem planejado, a carência de respostas e as recaídas podem ocorrer em todos os pacientes tratados. As seqüelas fibróticas são capazes de persistir podendo provocar recidivas após o término de uma longa fase de tratamento (20, 110).

No entanto *P. brasiliensis* é sensível à maioria dos antifúngicos, logo, a PCM pode ser tratada com várias drogas. Sugere-se o uso de itraconazol como a melhor opção terapêutica, exibindo menor período de terapia, é efetivo em 95% dos casos e associado a baixas taxas de recaídas (110). Entretanto, essa droga não está disponível na rede pública, sendo dessa forma a combinação de sulfametoxazol-trimetoprim a alternativa mais utilizada no Brasil, pois possui baixo custo e sua efetividade é aceitável. O custo social e econômico desta micose não é devidamente avaliado pelas autoridades de saúde (20).

O sucesso da terapia depende tanto do antifúngico utilizado, como do grau de disseminação das lesões e da capacidade imunológica do paciente. A regressão das alterações clínicas é observada entre um e seis meses após o início do tratamento. Entretanto, a erradicação do fungo nos tecidos infectados requer mais tempo, e os pacientes devem ser periodicamente examinados por meio de exames clínicos e complementares, para avaliar se ocorreu ou não a regressão dos sintomas e desaparecimento das lesões ativas (20).

Como a PCM é a infecção fúngica sistêmica de maior prevalência na América Latina, há diferenças nos tratamentos de escolha, de acordo com a severidade dos casos e suas estatísticas de cura e recidiva. É reportado, por exemplo, 3% de falha terapêutica, na Colômbia, quando a droga de escolha é o itraconazol, já no Brasil esse índice sobe para 13,8% (dados não publicados, Marques S.A., 2002).

A PCM distribui-se pelas regiões tropicais e subtropicais da América Latina; Brasil, Colômbia e Venezuela são os principais países afetados pela doença (111).

Estabelecer um panorama epidemiológico da PCM é de difícil execução, já que não se trata de doença de notificação compulsória como síndrome da imunodeficiência adquirida, tuberculose, entre outras. E, recentemente, tem sido incluída na lista de doenças negligenciadas, como malária, leishmaniose visceral,

doença de Chagas e doença do sono. O impacto na saúde pública dessas doenças é subestimado.

Há 100 anos da descoberta do agente etiológico da PCM, *P. brasiliensis*, a micose ainda necessita de um programa efetivo e permanente para a prevenção, diagnóstico, terapias e assistência aos pacientes, cujas complicações e sequelas ainda são reportadas após tratamento. A não notificação de novos casos contribui mais para esse cenário. O Hospital Universitário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto recebe uma estimativa anual de 40 casos, e complicações anatômicas, sequelas funcionais como insuficiência respiratória são relatadas em 20% dos pacientes (112). Nesse mesmo levantamento foi indicado, no período de 2000 a 2008, 5% de letalidade em 215 casos de pacientes infectados com *P. brasiliensis*.

Em Pernambuco, foi criado o “SANAR - Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas” pela Secretaria Estadual da Saúde e, tem como meta, até 2014, reduzir doenças negligenciadas e enfermidades tropicais endêmicas que atingem a população de baixa renda das cidades pernambucanas. A PCM não consta da lista, no entanto, faz-se necessário a criação de mais unidades do programa SANAR, distribuídas pelas cidades brasileiras e/ou suas regiões, tendo em vista que cada região, com suas características peculiares, compartilham ou não as mesmas doenças.

Estudo realizado entre 1996 a 2006 demonstrou que a PCM foi a principal causa de morte dentre as micoses sistêmicas, seguida por criptococose, candidíase e histoplasmose. Os Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná apresentaram as maiores taxas de mortalidade da PCM (113).

Admite-se que a enfermidade se manifesta em geral nas populações das zonas rurais e um crescente aumento dessa micose em zonas suburbanas tem sido observado, atacando indivíduos com as mais variadas profissões, sendo que a moléstia é caracterizada por uma forte debilitação do sistema imune do paciente, e que por isso acarreta um impacto sócio-econômico de alto grau, uma vez que, além das despesas com o tratamento, muitos portadores da doença acabam tornando-se incapazes para o trabalho em pleno período de produção e atividade.

Diversas pesquisas têm caminhado em direção a novas descobertas da patogenia da PCM, para tanto é necessário o uso de animais para experimentação,

prática essa que tem sido revista, analisada com o aumento crescente de frentes que são contra o uso de animais para experiências laboratoriais.

No contexto histórico, a utilização de animais em pesquisa de experimentação foi determinante na evolução das ciências biológicas e da saúde. Em 1885, Louis Pasteur sugeriu a criação de animais livres de germes para se compreender a função da flora intestinal e, desde essa época, estudos com cobaias têm sido realizados e padronizados no intuito de compreender e desenvolver moléculas como, por exemplo, vacinas e/ou drogas terapêuticas contra uma diversidade de patógenos. É indiscutível para os cientistas os benefícios do uso de cobaias para experimentação animal. Embora com os avanços das pesquisas com células humanas e as possibilidades, ainda inexploradas, porém, promissoras do uso de células tronco, os questionamentos à experimentação animal tomaram força, alavancados também pelos movimentos de defesa dos animais, surge a principal questão a ser respondida pelos cientistas, se há alternativas viáveis para a substituição de cobaias.

A lei Arouca, a qual trata de diretrizes para o uso de animais de experimentação recomenda que seja colocada em prática os “3 erres” *replacement* (substituição), *reducement* (redução), *refinement* (refinamento).

Invertebrados têm sido cada vez mais vistos como um modelo válido para estudar a virulência de patógenos humanos por causa das semelhanças entre os sistemas imunes inatos entre esses hospedeiros e mamíferos (114, 115). Além disso, mecanismos de virulência microbianos ambientais, especialmente de patógenos oportunistas, são provavelmente conservados entre os diferentes modelos avaliados.

Alguns hospedeiros invertebrados utilizados para estudos de virulência de fungos patogênicos humanos incluem os nemátodos *Caenorhabditis elegans* (116-119), a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (120-122), e *Galleria mellonella* (123-127).

As larvas de *G. mellonella* são de baixo custo, fáceis de manter, de manipular e sua utilização pode reduzir a necessidade de testes de patogenicidade em mamíferos, com uma redução concomitante no sofrimento dos animais mamíferos (123, 125, 128).



A resposta imune de insetos, tais como *G. Mellonella*, é semelhante a dos mamíferos e consiste em barreiras estruturais e passiva, com geração de respostas celulares e humorais através de hemócitos dentro da hemolinfa (129).

Compreendem-se como barreiras estruturais o rígido exoesqueleto, o sistema digestório e as barreiras respiratórias que constituem a primeira linha de defesa dos insetos. Os insetos cicatrizam rapidamente as suas feridas causadas por trauma ou invasão por parasitas, impedindo a perda fatal de fluidos corporais e a penetração de patógenos oportunistas. O tegumento e o trato digestivo representam barreiras físicas importantes contra a infecção e quando estas barreiras são ultrapassadas, os invasores tornam-se expostos a uma variedade de mecanismos celulares que interagem na defesa do hospedeiro. Os hemócitos constituem a barreira final do sistema de defesa dos insetos e atuam na cicatrização e na fagocitose, em respostas do tipo encapsulação e nodulação, fatores antimicrobianos naturais (síntese induzida de peptídeos e proteínas antimicrobianas) e fatores bioquímico-fisiológicos, que são respostas coordenadas direta ou indiretamente pelos vários tipos de hemócitos, dependente do número e dos tipos de hemócitos presentes na hemolinfa, garantindo o sucesso do sistema imunológico (130-132).

No estudo de proteínas do sistema de secreção do tipo III do bacilo gram-negativo, *Pseudomonas aeruginosa*, em ensaios de citotoxicidade usando o modelo em *G. mellonella* e células do tecido provenientes de mamíferos, observou-se, entre os resultados obtidos, bons níveis de correlação entre os dois modelos, o que validou o uso de invertebrados como modelo de estudo (115). Ainda com *P. aeruginosa*, Jander e outros demonstraram alta correspondência entre o uso de larvas e o uso de camundongos em modelos de infecção com bactérias mutantes (133).

Em corroboração aos estudos de bactérias gram negativas, Seed e Dennis (134) detectaram nos membros do complexo de *Burkholderia cepacia*, antigamente classificada como *Pseudomonas cepacia*, diferenças na patogenicidade entre as espécies quando infectadas em *G. mellonella*, igualmente reportado na literatura quando se usa modelo animal. Essas bactérias, altamente resistentes a antibióticos, são ditas como oportunistas e afetam principalmente pacientes com infecções respiratórias debilitantes. O estudo em *G. mellonella* busca com maior rapidez respostas referente a fatores de virulência que podem ser alvos em terapias.

Estudos recentes de *screening* de virulência são também encontrados para as bactérias *Campylobacter jejuni* (135), *Listeria monocytogenes* (136) os quais mostram a facilidade e rapidez no uso de modelos invertebrados e suas correlações positivas com os mamíferos, desta forma sugerem-se a substituição e redução desses animais.

Além disso, *G. mellonella* é um modelo eficaz para estudar patogênese fúngica, as larvas tem sido utilizada para investigar o papel da filamentação (137) e beta-glucanas (138) em *Candida albicans*. Os pesquisadores têm mostrado uma correlação significativa entre a virulência de *C. albicans* em *G. mellonella* e em camundongos (127).

*G. mellonella* também tem sido utilizada para estudar a patogenicidade de *Cryptococcus neoformans* (124), *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum* (139), *Aspergillus flavus* (140) e *A. fumigatus* (123). Além disso, as alterações morfológicas ocorridas em *C. neoformans* durante a infecção em camundongos tem sido correlacionadas com aquelas encontradas em *G. mellonella* e, assim, o uso desse tipo de inseto foi validado como um modelo de hospedeiro interessante e promissor para o estudo da virulência e da patogenicidade dessa levedura (141).

Em virtude da importância da busca de novos alvos terapêuticos, o presente trabalho baseou-se na produção de anticorpos policlonais e monoclonais contra antígenos como melanina, glicolipídeos e glicoproteínas extraídos da parede celular de *P. brasiliensis*, com o intuito de buscar melhoramento das terapias propostas até o presente momento, bem como esclarecimentos sobre a patogenia da PCM.

Além disso, diante ao crescente movimento de substituição ao uso de camundongos, avaliamos a patogenicidade das leveduras termodimórficas *P. lutzii* e *H. capsulatum* no modelo invertebrado *G. mellonella*.

## 2 OBJETIVOS

- a) Produzir anticorpos policlonais direcionados contra melanina extraída de *P. brasiliensis* e avaliar a atividade desses anticorpos *in vitro*, durante a fagocitose mediada por macrófagos peritoneais e ensaio de viabilidade celular na destruição do fungo.
- b) Produzir anticorpos monoclonais direcionados especificamente contra antígeno fúngico de natureza glicolipídica (CMH), e verificar sua função *in vitro*, durante a fagocitose mediada por macrófagos peritoneais e ensaio de viabilidade celular e dosagem de óxido nítrico na destruição do fungo. E verificar sua reatividade através da imunomarcagem com o auxílio de microscópio eletrônico.
- c) Investigar a associação do anticorpo monoclonal contra CMH,  $\alpha$ -CMH, na proteção ou na exacerbação da PCM através da imunização passiva, analisando *in vivo* a capacidade desses anticorpos em reduzir ou aumentar a carga fúngica em camundongos infectados com Pb18 por via intratraqueal.
- d) Produzir anticorpos monoclonais gerados contra glicoproteína de *P. brasiliensis* e avaliar sua reatividade através da imunomarcagem com o auxílio de microscópio eletrônico.
- e) Avaliar a atividade de anticorpos monoclonais gerados contra Hsp60 derivada de *Histoplasma capsulatum* na infecção experimental por *P. lutzii*.
- f) Avaliar novo modelo de infecção para *Paracoccidioides lutzii* e *Histoplasma capsulatum*, através do uso de hospedeiros invertebrados, como o inseto *Galleria mellonella*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Composição de carboidratos derivados de diferentes isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*

##### 3.1.1 Micro-organismos e condições de cultivo

Os isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, ED01, 01, 03, 18, 192, 339 e 1578 - amostras virulentas – exceto Pb192, isolado avirulento, foram empregados no presente estudo e mantidos no Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos do ICB-II da USP, a 37 °C em ágar Sabouraud dextrose. O isolado *P. brasiliensis* Pb01 está em processo de reconhecimento como nova espécie, *P. lutzii*, no presente trabalho adotamos o termo *P. lutzii* quando nos referimos ao isolado Pb01.

##### 3.1.2 Preparação das células de diferentes isolados de *P. brasiliensis* para a extração de carboidratos totais

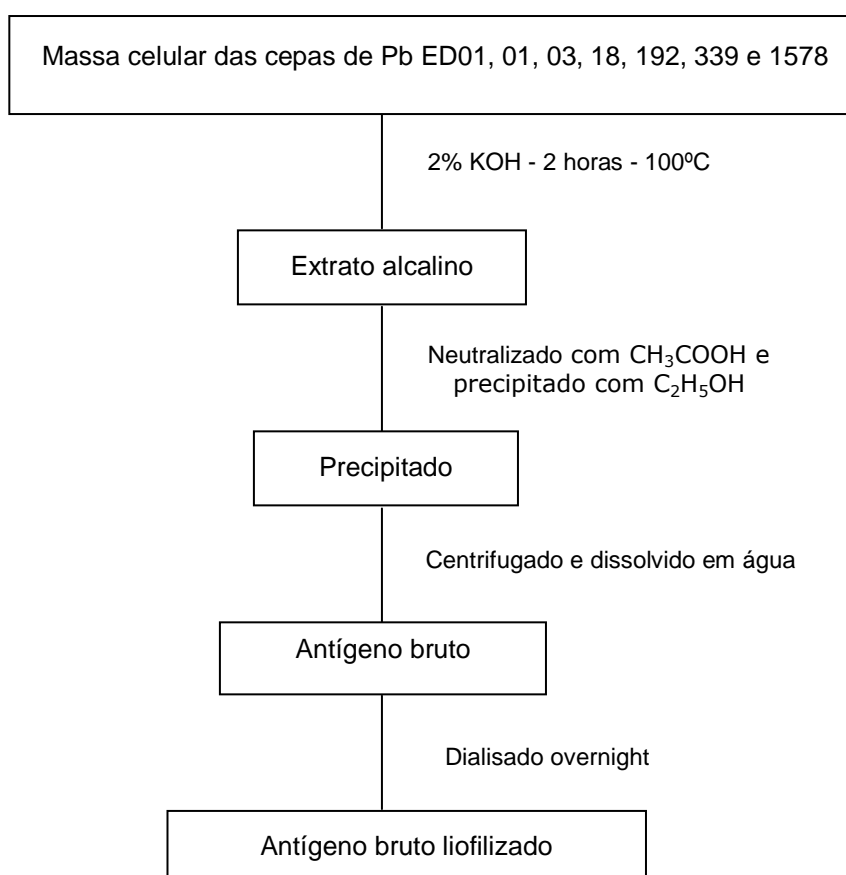
Leveduras de *P. brasiliensis*, isolados ED01, 01, 03, 18, 192, 339 e 1578, foram transferidas do ágar Sabouraud (Sanofi, França), para o caldo Sabouraud enriquecido com 0,5% de extrato de levedura e mantidas em agitação por sete dias, a 37 °C. Decorrido este período, as células foram mortas com timerosal (0,2 g/l) e coletadas após centrifugação a 685 g, por 10 minutos. As células coletadas foram congeladas a – 20 °C.

##### 3.1.3 Extração alcalina de diferentes isolados de *P. brasiliensis*

As massas celulares dos diferentes isolados foram submetidas à extração alcalina com hidróxido de potássio (KOH) a 2%, durante 2 horas a 100 °C. Os extratos alcalinos foram neutralizados com ácido acético glacial (CH<sub>3</sub>COOH), centrifugado a 1540 g durante 10 minutos, reduzidos em rotaevaporador, para 100 ml, e precipitados com três volumes de etanol. Os precipitados foram recuperados por centrifugação a 1540 g durante 10 minutos e, dissolvidos em água, e dialisados contra água destilada, *overnight* a temperatura ambiente. Após a diálise os

antígenos obtidos foram liofilizados, adaptado do protocolo descrito por Bittencourt e outros (26) e (142). Abaixo fluxograma do protocolo da extração alcalina.

**Figura 1** - Sequência da extração alcalina com KOH 2% de diferentes isolados de *P. brasiliensis*.



Fonte: Thomaz, 2012.

#### 3.1.4 Análise de monossacarídeos totais de diferentes isolados de *P. brasiliensis* por cromatografia gasosa (GC)

Para a quantificação das amostras polissacarídicas, foi necessário prepará-las pelo método de acetilação. Alíquotas das amostras de *P. brasiliensis* dos isolados ED01, 01 (atualmente classificado como *P. lutzii*), 03, 18, 192, 339 e 1578, solúveis em água, foram submetidas à aquecimento, durante três horas, a 100 °C, com ácido trifluoracético 3 M. Os materiais resultantes foram secos com auxílio de nitrogênio, adicionados boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) para redução das hexoses em seus derivados alditóis. Após 1 hora adicionou-se ácido acético parando a reação,

evaporou-se todo solvente em evaporador rotativo, em seguida colocou-se anidrido acético/piridina 1:1 (v/v) em diferentes ampolas de vidro, que foram incubadas à 100 °C por 1 hora. Decorrido esse período acrescentou-se água parando a reação e incubou-se *overnight* a temperatura ambiente. Os materiais foram lavados com clorofórmio (o dobro do volume) e desprezados os sobrenadantes, com auxílio de pipeta Pasteur. Em seguida foram lavados com água destilada por quatro vezes, para retirar a piridina do material resultante. As amostras foram secas em evaporador rotativo e nitrogênio, resultando em materiais hidrolisados e acetilados. Os monossacarídeos foram identificados na forma de seus derivados hexacetilados por cromatografia a gás em coluna DB-225 (30 m x 0,25 mm programada de 50 ° a 220 °C a 5 °C por minuto), por Philip Albert James Gorin, professor doutor da Universidade Federal do Paraná.

### 3.1.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) da amostra extraída por hidrólise alcalina de *P. brasiliensis* (isolado 18)

Foi analisada amostra, derivada da extração alcalina, do isolado de Pb18 usando espectrômetro Micromass Quattro LC. A amostra foi dissolvida em água destilada e aplicada em um fluxo de 10 µl/minuto. A voltagem do cone foi de 88 V e do capilar e extrator, 3,64 kV e 2 V respectivamente. A análise foi realizada no modo +ve e *scanning* de 150 a 1200 m/z. M/S foi obtido através do uso de energia de colisão de 139,9 ev por Philip Albert James Gorin, professor doutor da Universidade Federal do Paraná.

### 3.1.6 Dosagem de proteínas e açúcares totais de *P. brasiliensis* (isolado 18)

A quantificação de proteínas das amostras obtidas por hidrólise alcalina foi realizada pelo método de Bradford (143). Como padrão foi utilizado Soro de Albumina Bovina. E, a dosagem de açúcar total pelo método de Dubois (144).

### 3.1.7 Determinação do potencial zeta da amostra derivada da extração alcalina de *P. brasiliensis* (isolado 18)

O potencial zeta ( $\zeta$ ) é uma medida de carga, em milivolts, de partículas obtidas através da direção e da velocidade com que essas partículas se movem em um campo elétrico (145). A determinação do potencial é baseada na fórmula:  $\zeta = 4\pi\eta m/D$ . Onde  $\eta$  é a viscosidade,  $m$  é a mobilidade eletroforética da partícula e  $D$  é a constante dielétrica do meio (146).

Para a avaliação do  $\zeta$ , a amostra extraída da parede celular de Pb18 foi suspensa em solução de 0, 1 e 10 e 100 mM de cloreto de potássio (KCl), colocadas em cubetas apropriadas e foram analisadas em equipamento Zeta potential analyzer (Zeta-Plus; Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY) de acordo com Cordero e outros (147). Foram realizadas três leituras diferentes para cada molaridade testada.

## 3.2 Cultivo de *P. brasiliensis* na presença e na ausência de L-DOPA

As leveduras de *P. brasiliensis*, Pb18, foram cultivadas em meio líquido definido (148) na presença e ausência de 1,0 mM de L-DOPA (L-3,4 – dihidroxifenilalanina), por 15 dias, a 37 °C, sob agitação constante. As culturas foram mantidas na ausência de luz, para prevenir a fotopolimerização.

### 3.2.1 Extração e purificação das partículas de melanina

De acordo com Rosas e outros (101), as leveduras melanizadas de *P. brasiliensis* foram centrifugadas a 685 g por 10 minutos e descartado o sobrenadante. Este pellet de micro-organismos foi lavado em sorbitol 1 M e em citrato de sódio 0,1 M (pH 5.5), precipitadas por centrifugação a 685 g por 10 minutos e, mais uma vez o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em PBS e, enzimas que contém atividade de celulase, protease e quitinase, ou seja, funções que lisam a parede celular, proveniente de *Trichoderma harzianum*, foram adicionadas à concentração final de 10 mg/ml e incubadas durante 12 horas a 30 °C. Desta forma gerou-se protoplastos, os quais foram coletados por centrifugação a 685 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e os protoplastos foram lavados com PBS, com o auxílio do vórtex, e mais uma vez o

sobrenadante foi descartado; este procedimento foi repetido quatro vezes. Após lavagem, as células foram submetidas à agente desnaturante (tiocianato de guanidina 4 M) por 12 horas, e ocasionalmente utilizado vórtex para auxiliar na mistura da solução. Os debris celulares foram coletados por centrifugação, lavados com PBS e tratados com proteinase-K (1.0 mg/ml) em solução tampão de cloreto de cálcio 1mM, por 12 horas, pH 7.8. O material resultante foi lavado com PBS e fervido em HCl 6M, por 1 hora. O material remanescente, após a digestão com ácido, foi coletado por centrifugação, lavado extensivamente com PBS e dialisado contra água destilada, por 10 dias. O produto da diálise contém “melanina ghosts”, já que esta molécula é depositada na parede celular e membrana do fungo, sendo isolada com o mesmo tamanho e forma da estrutura original da levedura.

### **3.3 Preparação das células de *P. brasiliensis* para a extração de glicolípídeo neutro – monohexosilceramida - CMH**

As leveduras de *P. brasiliensis* foram preparadas de acordo ao item 3.1.2, descrito acima.

#### **3.3.1 Extração e purificação de CMH de *P. brasiliensis***

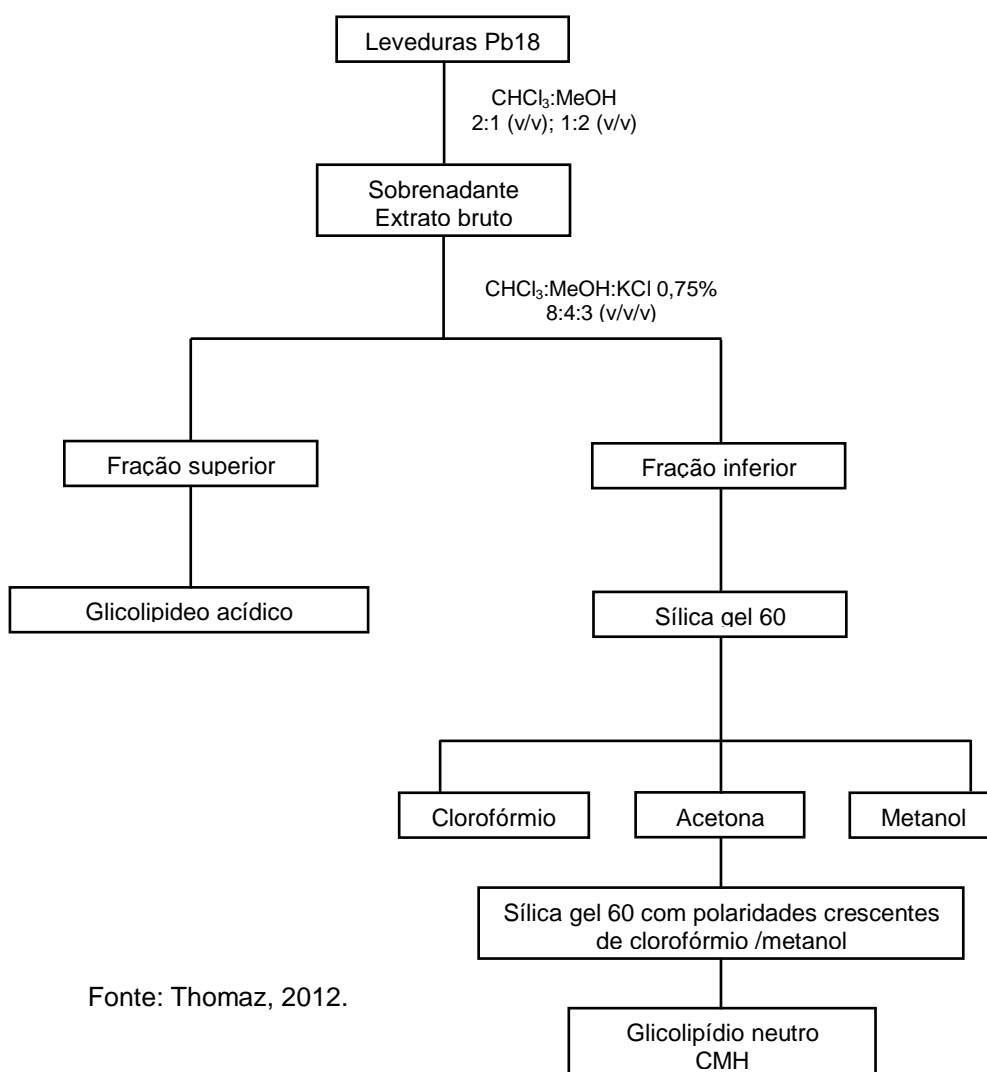
As células armazenadas a -20 °C foram delipidadas com CHCl<sub>3</sub>:MeOH (clorofórmio/metanol), na proporção 2:1 (v/v). A delipidação foi mantida *overnight*, sob agitação constante, à temperatura ambiente. O extrato foi separado com o uso de filtro sinterizado e, a massa celular foi delipidada mais uma vez com CHCl<sub>3</sub>:MeOH (clorofórmio/metanol), na proporção 1:2 (v/v), e o sobrenadante das duas extrações foram combinados, concentrados em evaporador rotatório, à vácuo e liofilizados, produzindo o lipídio bruto.

O extrato bruto foi fracionado em funil de separação com CHCl<sub>3</sub>:MeOH:KCl (clorofórmio/metanol/cloreto de potássio 0,75%), na proporção 8:4:3 (v/v/v), à temperatura ambiente, *overnight*, de acordo com Folch e outros (149). As duas fases desta partição (superior e inferior) foram analisadas por cromatografia de camada delgada, utilizando como solvente de corrida CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (clorofórmio/metanol/água), nas proporções 65:25:4 (v/v/v) e, revelada com 0,5% de orcinol em 3,0 M de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Os glicolípídios apresentam um padrão



de cor roxa. A fase inferior da partição de Folch foi fracionada em coluna de sílica gel 60 e eluída com clorofórmio, acetona e metanol. O perfil das amostras foi analisado através de cromatografia de camada delgada, e a fração eluída com acetona, contendo o CMH, foi purificada em outra coluna de sílica gel 60, eluída em diferentes proporções de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (clorofórmio/metanol - 95:5, 90:10, 80:20, 75:25 v/v) e metanol. Estas frações foram secas e avaliadas, quanto ao seu perfil, por cromatografia de camada delgada juntamente ao padrão de monohexosilceramida, cedido gentilmente pela Dra Marcia Ribeiro Pinto da Silva, professora da Universidade Federal Fluminense. Abaixo fluxograma da extração de glicolípido neutro (CMH).

**Figura 2** - Sequência da extração de CMH de *P. brasiliensis* isolado 18.



Fonte: Thomaz, 2012.

### 3.4 Imunização dos animais para produção de anticorpos monoclonais

#### 3.4.1 Imunização dos camundongos com CMH

Foram realizados dois protocolos para padronização de imunização com CMH.

Protocolo 1: Os camundongos da linhagem BALB/c, machos, com idade aproximada de seis semanas foram imunizados com CMH. A fração purificada de CMH foi resolvida em placa de sílica gel 60 e somente visualizada em vapores de iodo. Após a sublimação do iodo, o antígeno foi emulsificado na presença de adjuvante completo de Freund e sonificado por 15 minutos. A solução final continha 50 µg em 50 µl por animal e foi injetada via coxim plantar. Decorridas quatro semanas, o procedimento de imunização foi repetido, porém, com o uso de adjuvante incompleto de Freund, com volume final de 200 µl/animal, via intraperitoneal. Após cinco dias, o antígeno foi ressuspenso em PBS e inoculado via intraperitoneal. Três dias antes da obtenção de anticorpos monoclonais através da técnica de fusão, os animais receberam um reforço pela via intraesplênica (150).

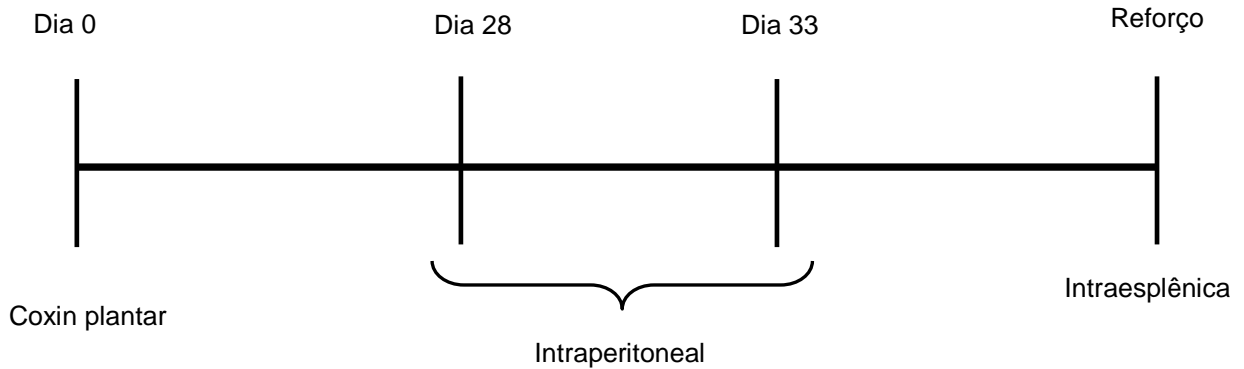
Protocolo 2: O mesmo procedimento acima descrito foi realizado, porém, foi utilizado como adjuvante Alumen e PBS 1:1 (v/v), em todas as imunizações, via subcutânea, em volume final de 100 µl/animal, exceto a última imunização, somente em PBS e através da via intraesplênica.

Foram realizadas sangrias pelo plexo ocular 24 horas antes de todas as imunizações para controle dos ensaios. O título de anticorpos foi monitorado através de ELISA e aqueles com melhores títulos foram utilizados para gerar hibridomas.

Abaixo, o delineamento dos dois protocolos acima descrito.

## Protocolo 1.

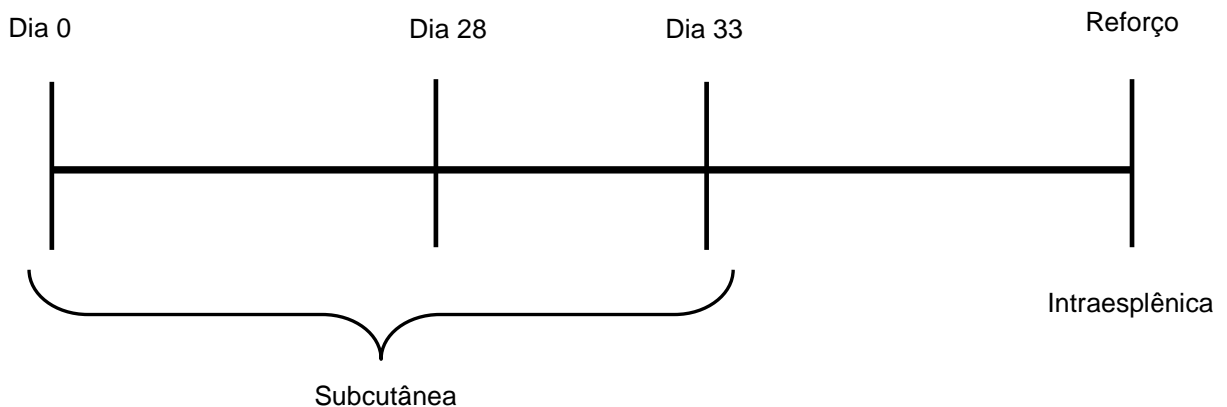
(Fórmula 1)



Fonte: Thomaz, 2012.

## Protocolo 2.

(Fórmula 2)



Fonte: Thomaz, 2012.

## 3.4.1.1 Cinética da produção de anticorpos contra CMH

A técnica utilizada para determinação da cinética dos anticorpos no sobrenadante de cultura das células foi através do ensaio imunoenzimático ELISA. As placas de microtitulação de 96 poços foram previamente tratadas com n-butanol, por 30 minutos, seguidas por três lavagens de cinco minutos com etanol, e sensibilizadas na concentração de 1 µg/poço de antígeno em 30 µl de etanol:metanol, 1:1 (v/v), e incubadas por 1 hora a 37 °C e, posteriormente *overnight* a 4 °C. Após a sensibilização, foi feito bloqueio com PBS-BSA 3%, *overnight* a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes com PBS, e incubadas com as

amostras de soro dos camundongos imunizados com CMH, sem prévia diluição, por 1 hora a 37 °C ou *overnight* a 4 °C. Após três lavagens, foram adicionados os conjugados: anticorpo secundário biotilado, anti-IgM e anti-IgG de camundongo, peroxidase e streptavidina-alcina fosfatase diluídos na proporção de 1:2000, e as placas foram incubadas 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente, cinco vezes e reveladas com substrato, *p*-nitrofenilfosfato (*p*-npp) em tampão para fosfatase alcalina (MgCl<sub>2</sub> 0,004 M e NaCO<sub>2</sub> 0,05 M, ph 9.8), no volume final de 100 µl/poço. A reação enzimática foi incubada por 30 minutos, protegida de luz. A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda a 405 nm.

#### 3.4.2 Imunização dos camundongos com melanina

Foram realizados dois protocolos para padronização de imunização com melanina.

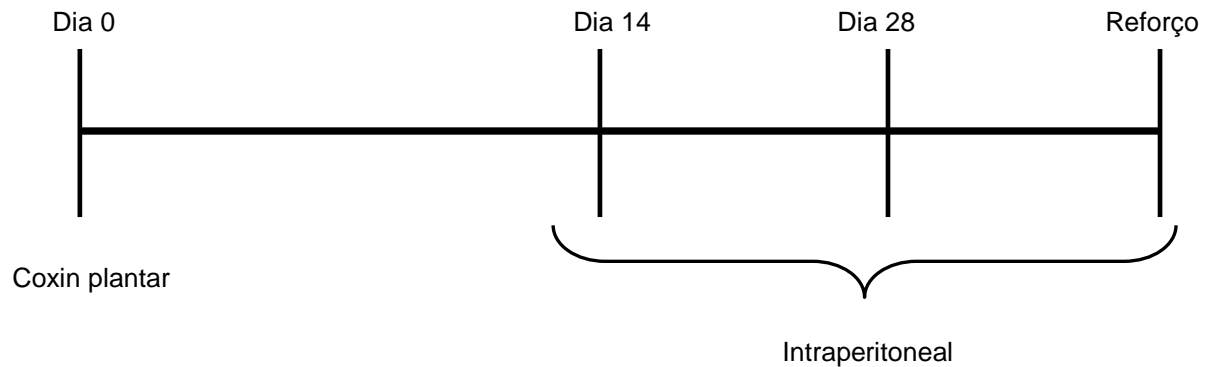
Protocolo 1: Os camundongos da linhagem BALB/c, machos, com idade aproximada de seis semanas foram imunizados com melanina “ghost”, na concentração de 300 µg emulsificado em adjuvante completo de Freund e PBS 1:1 (v/v), via coxin plantar. A imunização foi repetida após duas e quatro semanas, porém, com o uso de adjuvante incompleto de Freund, via intraperitoneal com volume final de 300 µl/animal. Decorrido esse período, os animais foram imunizados pela última vez, como descrito em (101).

Protocolo 2: O mesmo procedimento acima descrito foi realizado, porém, foi utilizado como adjuvante Alumen e PBS 1:1 (v/v), em todas as imunizações, via subcutânea, em volume final de 100 µl/animal.

Foram realizadas sangrias pelo plexo ocular 24 horas antes de todas as imunizações para controle do ensaio. O título de anticorpos foi monitorado através de ELISA e aqueles com melhores reatividades foram utilizados para gerar os hibridomas. Abaixo, o delineamento do experimento acima descrito.

## Protocolo 1.

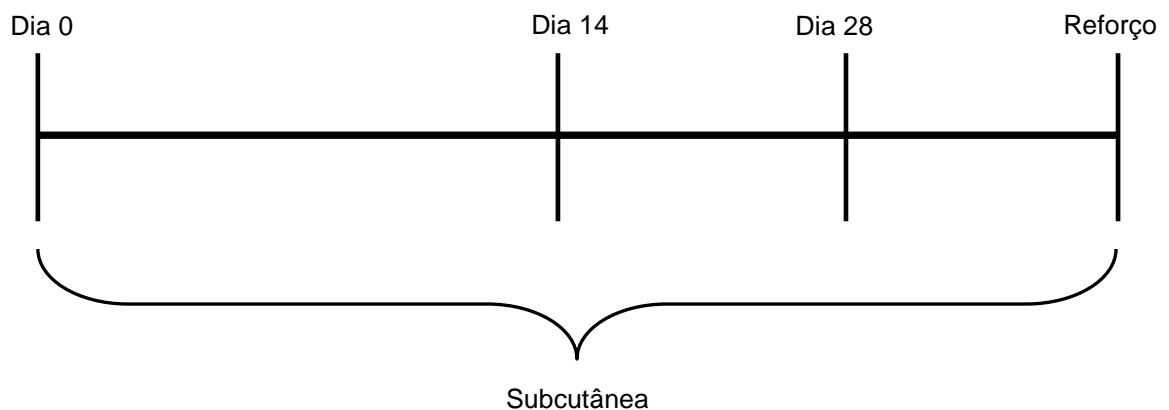
(Fórmula 3)



Fonte: Thomaz, 2012.

## Protocolo 2.

(Fórmula 4)



Fonte: Thomaz, 2012.

## 3.4.2.1 Cinética da produção de anticorpos contra melanina

A técnica utilizada para determinação da cinética dos anticorpos no sobrenadante de cultura das células foi ELISA, de acordo com (101). As placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com  $5 \times 10^6$ /poço de melanina "ghost", em 100  $\mu$ l de água destilada, e incubadas *overnight*, a temperatura ambiente. Após a sensibilização, as partículas de melanina foram fixadas em estufa a 60 °C por trinta minutos, seguido de bloqueio das ligações inespecíficas com BSA

2%, por duas horas à temperatura ambiente. Bloqueadas mais uma vez com 5% de leite desnatado, por duas horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas, por três vezes, com 0,1% de Tween 20 em tampão Tris salina entre os bloqueios. Em seguida, as placas foram incubadas com os sobrenadantes de cultura, sem prévia diluição, por 1h30min a 37 °C. Após três lavagens, foram adicionados os conjugados: anticorpo secundário biotinizado, anti-IgM e anti-IgG de camundongo e streptavidina-alcaldina fosfatase diluídos na proporção de 1:1000, e as placas foram incubadas por 1h30min a 37 °C. Decorrido este período, as ligações dos anticorpos foram detectadas com a adição de substrato, *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) em tampão para fosfatase alcalina (MgCl<sub>2</sub> 0,004 M e NaCO<sub>2</sub> 0,05 M, ph 9.8), no volume final de 100 µl/poço. A reação enzimática foi incubada por 30 minutos, protegida de luz. A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda a 405 nm.

#### 3.4.3 Imunização dos camundongos com antígeno glicoproteico obtido por hidrólise alcalina de *P. brasiliensis*, isolado 18

Foram realizados seis protocolos de imunização com antígeno de natureza glicoproteica, obtido pela extração alcalina com KOH 2%, conforme descrito no item 3.1.3.

Protocolo 1. Os camundongos da linhagem BALB/c, machos, com idade aproximada de seis semanas foram imunizados com antígeno glicoproteico de Pb18, na concentração de 200 µg emulsificado em Alumen e PBS 1:1 (v/v), via subcutânea. A imunização foi repetida após duas e quatro semanas. Na sexta semana foi realizado sangria nos animais e o título de anticorpos foi monitorado através de ELISA.

Protocolo 2. Nesse protocolo o antígeno glicoproteico de Pb18, na concentração de 200 µg foi emulsificado em adjuvante completo de Freund e PBS 1:1 (v/v), via coxin plantar. A imunização foi repetida após duas e quatro semanas, com adjuvante incompleto de Freund, via intraperitoneal com volume final de 300 µl/animal. Na sexta semana foi realizado sangria pelo plexo ocular nos animais e o título de anticorpos foi monitorado através de ELISA.

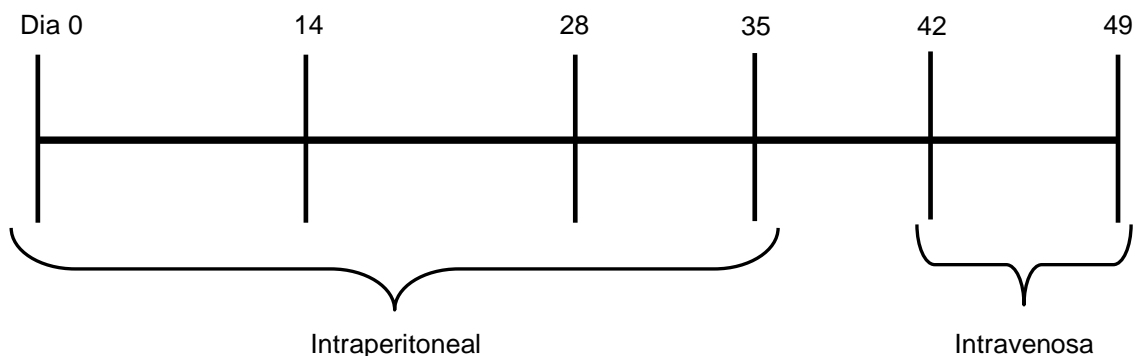
Protocolo 3. Camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com idade aproximada de seis semanas foram imunizadas com a glicoproteína, na concentração de 100 µg homogenizado em adjuvante Quil A (10 µg/animal), via

intraperitoneal. A imunização foi repetida em intervalos de sete dias, e ao todo foram feitas oito imunizações. Na oitava semana foi realizado sangria pelo plexo ocular nos animais e o título de anticorpos foi monitorado através de ELISA. Dois dias antes da obtenção de anticorpos monoclonais através da técnica de fusão foi dado mais um reforço, *booster*.

Protocolo 4. Nesse terceiro protocolo a glicoproteína foi conjugada covalentemente com a proteína de BSA. O protocolo de conjugação segue abaixo descrito, item 3.4.3.2. Esse ensaio foi realizado com duas concentrações diferentes, 50 µg e 100 µg do conjugado proteína-glicoproteína. As vias de imunização foram intraperitoneal e intravenosa. Segue abaixo fluxograma da imunização desse protocolo. O título de anticorpos foi monitorado através de ELISA. Abaixo desenho esquemático do protocolo 4.

Protocolo 4.

(Fórmula 5)



Fonte: Thomaz, 2012.

Protocolo 5. Nesse protocolo também foi realizada conjugação, usando como proteína carreadora mcKLH, "Mariculture Keyhole Limpet Hemocyanin". O protocolo de conjugação seguiu as instruções do fabricante (Pierce Biotechnology, USA) e a concentração do antígeno foi de 200 µg/dose. O conjugado com mcKLH foi emulsificado em adjuvante de Freund completo e, a partir da segunda imunização, após 14 dias, foi utilizado adjuvante incompleto, seguido de mais quatro imunizações com intervalos de 7 dias. O título de anticorpos foi monitorado através de ELISA.

Protocolo 6. Os animais receberam células leveduriformes de *P. lutzii* autoclavadas, na concentração de  $10^6$  células por camundongo, emulsificado em adjuvante completo de Freund. E, a partir da segunda imunização, 14 dias após, foi

utilizado adjuvante incompleto de Freund, foram feitas 4 imunizações ao total, com intervalos de 7 dias entre elas. Todas as imunizações foram intraperitoneais. O título de anticorpos foi monitorado através de ELISA.

#### *3.4.3.1 Cinética da produção de anticorpos contra antígeno de natureza polissacarídica*

As placas de microtitulação de 96 poços (NUNC-Maxisorp) foram sensibilizadas com 10 µg/poço do antígeno, a glicoproteína de Pb18, em 0,1 M de tampão carbonato, pH 9.6, incubadas *overnight* a 37 °C. Após a sensibilização, os poços foram lavados com PBS-Tween 20 0,1% e bloqueados com PBS-*milk* 1%, por 1 hora a 37 °C. Após serem lavados novamente seguiu-se a adição das amostras diluídas na mesma solução de bloqueio, por 2 horas a 37 °C. Decorrido o período de incubação, foi adicionado anticorpo secundário biotilado, anti-IgM e anti-IgG de camundongo, peroxidase e streptavidina-alcina fosfatase diluídos na proporção de 1:1000, incubados por 1 hora a 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e, reveladas com substrato, *p*-nitrofenilfosfato (*p*-npp) em tampão para fosfatase alcalina (0,004 M MgCl<sub>2</sub> e 0,05 M NaCO<sub>2</sub>, pH 9.8), no volume final de 100 µl/poço. A reação enzimática foi incubada por 30 minutos, protegida de luz a temperatura ambiente. A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda a 450 nm.

#### *3.4.3.2 Conjugação da glicoproteína, derivada de Pb18, à proteína de BSA e sua purificação*

A amostra de Pb18, derivada da hidrólise alcalina, a qual tem sua natureza glicoprotéica, foi dissolvida em volumes variáveis de tampão de 0,1 M borato de sódio, pH 9 e filtrada em 0,22 µm. No tempo 0, (t = 0) foram adicionados volumes variáveis de 1-ciano-4-dimetilaminopiridina tetrafluoroborato, CDAP (Sigma-Aldrich, EUA), o produto foi ressuspenso em acetonitrila (Sigma-Aldrich, EUA), vagorosamente, gota por gota. No t = 30 segundos, foram adicionados volumes variáveis de 0,5 M de hidróxido de sódio (NaOH), no intervalo de 3 a 7 minutos adicionado BSA em tampão de 0,15 M de hepes. Decorridas três horas, a reação foi parada com o acréscimo de 100 µl de etanolamina em 0,75 M de tampão de hepes,



pH 7. A conjugação foi realizada sob agitação constante, a temperatura ambiente. Após quatro horas do tempo inicial, o conjugado glicoproteína-proteína foi purificado por HPLC, usando coluna S200HR (GE Healthcare Life Science), equilibrada com salina. O solvente de corrida foi PBS, pH 7, e a purificação foi coletada em frações de 1,2 ml, com fluxo contínuo de 0,5/min. A presença de carboidratos e proteínas nas frações foram confirmadas pelos ensaios fenol ácido sulfúrico e ensaio de Bradford, itens 3.1.5 e 3.1.6, respectivamente. Como controles foram utilizadas amostra somente dissolvida em tampão de borato de sódio, e amostra com todos os demais reagentes acima descritos, com exceção do agente ativador, CDAP. O mesmo procedimento foi feito com o controle do BSA, ou seja, BSA dissolvido em tampão de borato e com todos os demais reagentes, exceto o CDAP. Os controles foram purificados pela mesma metodologia. Os volumes variáveis representam diferentes modificações, exibidos na tabela 1 abaixo, para adequação da técnica, conforme descrito por Chow e Casadevall (151). Cada conjugação foi feita duas vezes em momentos diferentes.

**Tabela 1** - Volumes e concentrações dos reagentes utilizados na conjugação do polissacarídeo-proteína.

	Polissacarídeo (mg)	Tampão de Borato (µl)	CDAP (µl)	NaOH (µl)	BSA (mg)	Etanolamina (µl)
1	7.2 (300µl)	700	100 (10mg)	200	89,32	100
2	7,5 (300µl)	700	100 (10mg)	200	89,32	100
3	13 (520µl)	500	100 (10mg)	200	89,32	100
4	12,5 (500µl)	500	150 (15mg)	200	89,32	100
5	17,5 (700µl)	700	150 (15mg)	200	89,32	100
6	20 (450µl)	550	100 (10mg)	200	89,32	100
7	15 (425µl)	425	200 (20mg)	200	89,32	100
8	10 (400µl)	400	150 (15mg)	200	90	100
9	15 (600µl)	400	130 (13mg)	200	90	100
10	15 (600µl)	300	130 (13mg)	200	90	100
11	15 (600µl)	500	130 (13mg)	200	90	100
12	15 (600µl)	200	130 (13mg)	200	90	100
13	15 (600µl)	200	130 (13mg)	200	90	100

### 3.5 Preparação de monocamada de macrófagos primários, *feeder layer*, para utilização na técnica de fusão

Camundongos da linhagem BALB/c foram estimulados, quanto ao recrutamento de macrófagos peritoneais, com tioglicolato a 3%, 72 horas antes da obtenção dessas células. Vinte e quatro horas antes da técnica de fusão, o lavado peritoneal foi diluído em meio RPMI, enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos não essenciais, distribuídos em placas de 96, 48 e 24 poços. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%.

#### 3.5.1 Seleção das células de mieloma

As células de mieloma murino da linhagem SP2-0 utilizadas na fusão foram selecionadas *in vitro* através do tratamento prévio com 8-azaguanina (20 µg/ml), uma droga anti-metabólica, com trocas de meio a cada 48 horas e decorridos cinco trocas a droga foi retirada. As células mutantes sobrevivem a 8-azaguanina (152).

#### 3.5.2 Obtenção de anticorpos monoclonais contra CMH

Foram realizados sete protocolos para técnica de fusão utilizando CMH como antígeno.

Protocolo 1. Células do baço e linfonodos foram utilizadas na fusão com células da linhagem SP2-0, na proporção de  $1 \times 10^7$  células de mieloma para um baço e  $5 \times 10^6$  para os linfonodos poplíteo e inguinais. A fusão das células foi realizada na presença de 50% de polietilenoglicol de 1450 de peso molecular (P7181-Sigma-Aldrich, EUA), 1 ml por 1 minuto, gota a gota, em meio Hybridoma-SFM (Gibco), em banho-Maria previamente aquecido a 37 °C. Aguardou-se mais 1min 30s em repouso, seguido do acréscimo de 20 ml de meio, gota a gota por 1 minuto e mais 4 minutos em repouso. As células foram homogeneizadas lentamente e foram centrifugadas a 250 g e o pellet ressuspenso no volume total das placas. As células foram plaqueadas sobre *feeder layer*, preparado previamente (24 horas e/ou 48 horas), em meio Hybridoma-SFM enriquecido de 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e na presença de 2% HAT 50x, 1 mM de β-mercaptoetanol, 25 mM de hepes, 2 mM de piruvato de sódio, 1 µg/ml de gentamicina e incubadas a 37 °C em

estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. O meio foi trocado em dias alternados. Decorridos 10 dias após a fusão, o meio foi trocado, mas utilizando apenas HT, sem aminopterina, adaptado do protocolo descrito (150). A hipoxantina e timidina permaneceram no meio por mais 10 dias. Esse protocolo foi repetido três vezes.

Protocolo 2. O mesmo protocolo acima descrito foi realizado, porém, o meio de cultura foi RPMI 1640 da Vitrocell.

Protocolo 3. Protocolo 2, com as seguintes modificações: o HAT foi adicionado 24 horas após a fusão.

Protocolo 4. Protocolo 2, com as seguintes modificações: PEG 1 ml por 2 minutos, gota a gota, aguardou-se mais 2 minutos em repouso, seguido do acréscimo de 20 ml de meio, gota a gota por 2 minutos e mais 2 minutos em repouso.

Protocolo 5. Protocolo 4 com uso de PEG de peso molecular 1.300 - 1600 (P-7777-Sigma-Aldrich, EUA).

Protocolo 6. Protocolo 5, mas utilizando a concentração de esplenócitos/SP2-0 - 2:1.

Protocolo 7. Protocolo 1, com as seguintes modificações: foi acrescido 50 µl de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, EUA), concentração celular de esplenócitos/SP2-0 - 2:1 e 15% de soro fetal bovino (Gibco, Life-Technologie, EUA) e RPMI 1640 (Gibco). Foi utilizado nessa fusão somente o baço, no qual foi injetado 15 ml de RPMI. O baço estava sobre uma tela, cujo debris celular fica retido e somente os esplenócitos passam pela malha da tela.

### *3.5.2.1 Clonagem dos hibridomas secretores de anticorpos contra CMH*

Os hibridomas obtidos da fusão que apresentaram maior reatividade por ELISA foram selecionados para clonagem por diluição limitante. As células foram diluídas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos não essenciais, 25 mM de HEPES e 2 mM de piruvato de sódio, de modo que as células ficaram distribuídas na proporção de 1 célula por poço em uma placa de cultura com 96 poços. Os hibridomas foram observados diariamente por microscopia óptica.

### *3.5.2.2 Expansão dos hibridomas secretores de anticorpos contra CMH*

Os hibridomas reativos por ELISA, diluídos conforme item acima 3.5.1.1, foram expandidos sequencialmente em placas de 24 poços, sobre nova camada de *feeder layer*, em meio RPMI suplementado.

### 3.5.2.3 *Obtenção de imunoglobulinas de sobrenadante de cultura de hibridoma específicos para CMH*

Os sobrenadantes de cultura das placas de hibridomas secretores de anticorpos contra CMH, foram coletados e armazenados a -20 °C.

### 3.5.2.4 *Purificação em membrana de PVDF (Polyvinylidene Fluoride) dos anticorpos anti-CMH presentes no sobrenadante de cultura de hibridomas*

Foram solubilizados 500 µg de CMH em 100 µl de metanol e aplicados em membrana de PVDF (3 cm/6cm). A membrana foi colocada em estufa, a 37 °C, para secagem durante as aplicações e, posteriormente, bloqueadas com PBS-BSA 1%, por 3 horas, em temperatura ambiente, sob agitação. O sobrenadante de cultura das placas de hibridoma contra CMH foram diluídas 1:2 em PBS e incubados *overnight*, a 4 °C. A membrana foi lavada 4 vezes com PBS, durante 5 minutos, sob agitação. Para eluição dos anticorpos anti-CMH as membranas foram tratadas com 3 ml de tampão glicina - 0,2 M pH 2.8, seguida de neutralização com TRIS-HCl 3 M pH 8.8. A amostra eluída foi analisada por SDS-PAGE.

### 3.5.2.5 *SDS-PAGE*

Para verificação do perfil proteico do sobrenadante de cultura de hibridomas, foi realizado eletroforese vertical em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (153), em equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad). O gel de separação linear confeccionado foi na concentração de 12% de acrilamida, em tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8.8, contendo 0,4% de SDS e o gel de empilhamento com acrilamida 3%, em tampão Tris-HCl 0,5M pH 6.8 contendo 0,4% de SDS. As amostras analisadas foram preparadas na concentração de 1 mg/ml, dissolvidas em tampão de amostra – Tris 62,5 mM pH 6.8, 20% de glicerol, 2% de SDS à 10%, 5%

de  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,025% de azul de bromofenol e 37% de água destilada, e ainda foram fervidas por 5 minutos. A corrida eletroforética foi realizada com voltagem constante, 100 volts, em tampão de corrida – Tris Base 250 mM, glicina 1,92 M e 1% de SDS. Após corrida, o gel foi corado com Comassie Brilhante Blue e pela prata.

### 3.5.3 Obtenção de anticorpos monoclonais contra melanina

Foram realizados cinco protocolos para técnica de fusão utilizando melanina como antígeno.

Protocolo 1. Células do baço e linfonodos foram utilizadas na fusão com células de mieloma murino da linhagem SP2-0, na proporção de  $1 \times 10^7$  células de mieloma para um baço e  $5 \times 10^6$  para os linfonodos. A fusão das células foi realizada na presença de 50% de polietilenoglicol de 1300 - 1600 de peso molecular (P7777-Sigma-Aldrich, EUA) 1ml por 2 minutos, gota a gota, em meio Hybridoma-SFM (Gibco, Life-technologies, EUA), em banho-Maria previamente aquecido, 37 °C. Aguardou-se mais 2 minutos em repouso, seguido do acréscimo de 20 ml de meio, gota a gota por 2 minutos e mais 4 minutos em repouso. As células foram homogeneizadas lentamente. Os esplenócitos, as células SP2 e as células fusionadas foram centrifugados a 250 g e o pellet ressuspensão no volume total das placas. As células foram plaqueadas sobre o *feeder layer*, preparado previamente, em meio Hybridoma-SFM enriquecido de 20% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e na presença de 2% HAT 50x, 1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 25 mM de hepes, 2 mM de piruvato de sódio, 1  $\mu$ g/ml de gentamicina e incubadas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. O meio foi trocado em dias alternados. Decorridos 10 dias após a fusão, o meio foi trocado, mas utilizando apenas HT, sem aminopterina, adaptado do protocolo descrito (101).

Protocolo 2. O mesmo protocolo acima descrito foi realizado, porém, o meio de cultura foi RPMI 1640 da Vitrocell.

Protocolo 3. Protocolo 2, mas utilizando a concentração de esplenócitos/SP2-0 de 5:1.

Protocolo 4. Protocolo 2, mas utilizando a concentração de esplenócitos/SP2-0 de 2:1.

Protocolo 5. Protocolo 4, com as seguintes modificações: PEG 1 ml por 1 minuto gota a gota, aguardou-se mais 1 min 30 seg em repouso, seguido do acréscimo de 20 ml de meio, gota a gota por 2 minutos e mais 2 minutos em repouso usando 15% de de soro fetal bovino.

#### 3.5.4 Obtenção de anticorpos monoclonais contra antígeno de natureza glicoprotéica derivado de *P. brasiliensis*

Os anticorpos monoclonais contra o antígeno glicoprotéico, extraído da parede celular do Pb18, foi produzido em “Hybridoma Facility of the Center at the Albert Einstein College of Medicine”. Utilizando métodos previamente estabelecidos (154), e três linhagens celulares de mieloma, NOS, Bcl2 e SP2.

### 3.6 Ensaios *in vitro* da atividade de anticorpos monoespecíficos gerados contra monohexosilceramida extraída de *P. brasiliensis*

#### 3.6.1 Ensaio de fagocitose

Uma monocamada de macrófagos da linhagem J774.16, foi plaqueada na concentração de  $5 \times 10^4$  células por poço em meio RPMI 1640 contendo 50 U/ml IFN- $\gamma$ , em placas de 24 poços. A placa foi incubada a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após esse período de incubação, os poços foram lavados com RPMI e a amostra do sobrenadante de cultura, obtidas da fusão com antígeno de CMH e, purificada por PVDF, conforme itens 3.5.1 até 3.5.1.4, acima descritos, foram adicionadas, na concentração de 100  $\mu$ g/ml, na presença e ausência de soro pré-imune de camundongos da linhagem BALB/c, e adicionado  $1 \times 10^4$  leveduras do isolado Pb18 por poço. Como controle foi utilizado anticorpo irrelevantes IgM (12A1) na presença e ausência de soro pré-imune, em meio RPMI 1640 suplementado com IFN- $\gamma$ . Todas as amostras de soro foram inativadas por 30 minutos a 56,5°C em banho Maria, quando usado imunoglobulina IgG nos ensaios.

As placas foram incubadas no período de 12 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final desse período, os poços foram lavados com RPMI, e 0,15 M de  $\alpha$ -metil manopiranosídeo para retirada de leveduras aderidas e não internalizadas,

decorrida a lavagem, foram adicionados 500 µl/poço de metanol frio e mantido por 30 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS, 50 µl de Giemsa diluído 1:20 foi adicionado. Através de microscópio foi determinado o índice de fagocitose.

### 3.6.1.1 Índice de fagocitose

O índice de fagocitose foi determinado através da seguinte fórmula:

$$PI = P \times F$$

P = número médio de macrófagos fagocíticos

F = número médio de leveduras internalizadas

Um número mínimo de 200 células foi observado para a realização dos cálculos.

### 3.6.2 Ensaio de viabilidade celular

O mesmo experimento relatado para fagocitose, nas mesmas condições, foi usado para verificar a viabilidade das células fúngicas. Após o período de incubação do ensaio e logo após a lavagem com  $\alpha$ -metil manopiranosídeo, os poços incubados com as células leveduriformes, células de defesa e os anticorpos foram lavados com água destilada estéril para lisar os macrófagos. As células foram plaqueadas em meio de Infusão de Coração e Cérebro, "Brain Heart Infusion" (BHI), suplementado com 4% de soro fetal bovino, 5% de sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* isolado 192 (avirulenta), estreptomomicina e penicilina a 1%, conforme preconizado por Castañeda e outros (155) e incubadas a 37 °C. Decorridos 10 dias de incubação o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foram contados.

### 3.6.3 Determinação da liberação de óxido nítrico (NO)

Em triplicata, 100 µl das amostras (sobrenadante do ensaio de fagocitose, item 3.6.1) foram colocadas em placas de 96 poços e, como padrão, foi utilizada uma solução de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) em diferentes concentrações (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625 µM). Foram adicionados às amostras e ao padrão 50 µl de reagente de Griess (0,1% N-1 naftil-etil-enediamina, 1% sulfanilamida, 2,5% de

ácido fosfórico). A absorbância foi determinada por leitor de ELISA (Labsystems iEMS Analyser, Helsinki) com filtro de 550 nm. A quantidade de NO nas amostras foi calculada utilizando-se como referência a curva-padrão de nitrito de sódio.

#### 3.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Células leveduriformes de Pb18 foram crescidas em caldo Sabouraud por cinco dias a 37 °C, sob agitação constante. As células foram lavadas três vezes com PBS estéril e fixadas em 1% de ósmio em água ultrapura e desidratado antes da incorporação na resina. Cortes ultrafinos de 70 nm foram reunidos sobre grades de cobre e corados com acetato de uranila 0,5% em água ultrapura, e corados novamente em citrato de chumbo 0,5% em água ultrapura. Os materiais foram transferidos para telas revestidas com Formvar-carbono, para imunomarcação. O preparo dos cortes foi realizado pelo laboratório de Imunomarcação do Departamento de Imunologia no Instituto de Ciências Biomédicas da USP. As crio-seções, em triplicatas, foram incubadas com TBS 0,05 M, pH 7.2, bloqueados os sítios de ligação inespecífica com TBS-BSA 1% pH 7.2 e incubadas com anticorpo primário, amostra derivada da fusão gerada contra CMH, na diluição de 1:10, diluído em TBS 0,05 M-BSA 1%, pH 7.2, *overnight* a 4°C em câmara úmida. Seguidas por nova lavagem com TBS 0,05 M-BSA 1%-Tween 20 0,1%, pH 7.2, segundo bloqueio com TBS 0,05 M-BSA 1% pH 8.2 e incubadas com anticorpo secundário (cabra anti IgG de coelho/mouse marcado com partículas de ouro coloidal de 10 nm de diâmetro) diluído 1:20 em TBS 0,05 M-BSA 1%, seguido por uma última lavagem. Os controles: positivo e negativo foram submetidos ao mesmo protocolo exceto a incubação com anticorpo primário. Todas as soluções foram filtradas em filtro milipore (0,22 µm TPP, Suíça). Os cortes ultrafinos foram examinados em um microscópio eletrônico JEOL 100 CX-II.

### **3.7 Ensaios *in vitro* da atividade de anticorpos policlonais gerados contra melanina extraída de *P. brasiliensis***

Os soros policlonais dos animais imunizados com melanina, pelos diferentes protocolos (item 3.4.2.1), foram coletados e armazenados a -20 °C e, usados na avaliação da atividade *in vitro* contra *P. brasiliensis*.



### 3.7.1 Ensaio de fagocitose

O mesmo experimento descrito acima, item 3.6.1, foi realizado com as amostras obtidas do soro policlonal contra melanina, na concentração de 100 µg/ml. Como controles foram utilizados anticorpos irrelevantes, IgG (18B7) e IgM (12A1). Através de microscópio foi determinado o índice de fagocitose.

### 3.7.2 Ensaio de viabilidade celular

O mesmo experimento relatado para fagocitose, nas mesmas condições, e conforme descrito no item 3.6.2, foi usado para verificar a viabilidade das células fúngicas.

## **3.8 Ensaios *in vivo* da atividade de anticorpos monoclonais contra CMH derivado de *Colletotrichum gloeosporioides* na infecção experimental por *P. brasiliensis***

Foi avaliada a atividade *in vivo* do anticorpo monoclonal gerado contra CMH de *Colletotrichum gloeosporioides*, clone α-CMH, cedido gentilmente pela pesquisadora responsável Profa. Dra. Eliana Barreto-Bergter, professora e pesquisadora da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Professor Paulo Goés.

### 3.8.1 Expansão do Anticorpo monoclonal α-CMH

O anticorpo α-CMH foi expandido, *in vitro*, através do cultivo do clone em meio de RPMI suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 10% de soro fetal bovino e 0,1% de estreptomicina/penicilina. Os sobrenadantes de cultura foram armazenados a 4°C. Concentrados por AMICON (Millipore, Alemanha), com membrana de 10Y (Millipore, Alemanha), filtrados com filtro 0,22 µm e finalmente dosados em NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, EUA). Seguidos por purificação através de coluna de imunoafinidade, Proteína A, de acordo com o fabricante e dialisados e concentrados em AMICON de ultra centrifugação, com membrana de 100 kDa, e dosados novamente em NanoDrop 1000.

### *3.8.1.1 Animais utilizados*

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c, SPF com aproximadamente 6-8 semanas com peso aproximado de 25 gramas, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

### *3.8.1.2 Preparação do inóculo*

Células leveduriformes do isolado Pb18 foram coletadas e lavadas com PBS estéril. A contagem de leveduras, exceto brotamentos, foi realizada em Câmara de Neubauer. A viabilidade do inóculo foi determinada pela técnica de exclusão de células não vitais coradas por azul de trypan.

### *3.8.1.3 Infecção Intratraqueal*

Camundongos divididos em grupos de 6 a 10 animais receberam 1mg do anticorpo  $\alpha$ -CMH, administrados 24 horas antes da infecção. Como controle, foi utilizado anticorpo irrelevante A4.

Os camundongos foram infectados por via intratraqueal segundo Taborda e outros (58), utilizando-se o inóculo de  $3 \times 10^5$  leveduras por camundongo.

Os animais foram anestesiados com uma solução contendo: 80 mg/kg de Ketamina e 10 mg/kg de Xilazina. Decorridos aproximadamente 10 minutos, os animais anestesiados foram submetidos à infecção. Por uma incisão transversal na pele do pescoço a traquéia foi exposta e nela foi injetada a suspensão fúngica, com o auxílio de uma seringa de insulina. A sutura foi realizada com auxílio de fio cirúrgico.

Terminada a intervenção cirúrgica, os animais foram mantidos sob fonte moderada de calor com o objetivo de controlar a hipotermia transitória, causada pela anestesia.

#### 3.8.1.4 Histopatologia

Após 15,30 e 60 dias de infecção os animais foram sacrificados e amostras de pulmão dos camundongos infectados foram encaminhadas ao Laboratório de Histotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas, no Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo, para fixação em formalina a 10% para posterior inclusão em parafina, preparação da lâmina e coloração pelo método de Gomori-Grocott.

#### 3.8.1.5 Determinação da carga fúngica nos pulmões

Após 15, 30 e 60 dias de infecção foi realizado o sacrifício dos animais, os órgãos (pulmão, baço e fígado) foram macerados e pesados. Com o auxílio de um homogenizador manual, os tecidos foram rompidos e lavados com PBS estéril. Desta solução, 100 µl foram plaqueados em meio BHI suplementado com 4% de SFB, 5% de sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* isolado 192 (avirulenta) estreptomicina e penicilina a 1%, conforme preconizado por Castañeda e outros (155). As placas foram mantidas a 37 °C por um período de 10 dias. O número de colônias foi contado e os resultados foram expressos em UFC por grama de tecido.

#### 3.8.1.6 Detecção e quantificação de citocinas

A detecção de diferentes citocinas foi realizada quantitativamente pelo método de ELISA, conforme instruções do fabricante (BD-PharMingen, EUA), utilizando amostra do homogenato de pulmão extraída dos camundongos BALB/c e mantidas em solução contendo inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, EUA).

### **3.9 Ensaios *in vitro* da atividade de anticorpos monoclonais contra CMH derivado de *Colletotrichum gloeosporioides* na infecção experimental por *P. brasiliensis***

#### **3.9.1 Microscopia eletrônica de transmissão**

A mesma técnica descrita no item 3.6.4 foi realizada usando o anticorpo monoclonal  $\alpha$ -CMH, gerado contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*.

### **3.10 Avaliação da atividade de anticorpos monoclonais gerados contra Hsp60 derivada de *Histoplasma capsulatum* na infecção experimental por *P. lutzii***

Foram avaliadas as atividades *in vivo* e *in vitro* dos anticorpos monoclonais, 4E12, de isotipo IgG2a e 7B6, de isotipo IgG2b, gerados contra Hsp60 de *Histoplasma capsulatum*. Os clones foram cedidos gentilmente pelo pesquisador e professor Joshua D. Nosanchuk e por Allan J. Guimarães, do Albert Einstein College of Medicine, em Nova York. Os anticorpos foram expandidos da mesma forma descrita para o anticorpo monoclonal  $\alpha$ -CMH, item 3.8.1.

#### **3.10.1 Animais utilizados**

Foram utilizados camundongos, fêmeas da linhagem BALB/c, SPF com aproximadamente 6-8 semanas com peso aproximado de 25 gramas, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

#### **3.10.2 Preparação do inóculo**

Células leveduriformes de *P. lutzii* foram utilizadas de acordo com a metodologia anteriormente descrita, item 3.8.1.2.

### 3.10.3 Infecção Intratraqueal

O mesmo procedimento descrito no item 3.8.1.3 foi realizado com os anticorpos monoclonais 4E12 e 7B6, no entanto utilizou-se o inóculo de  $1 \times 10^6$  leveduras por camundongo.

### 3.10.4 Histopatologia

Amostras de pulmão dos camundongos infectados foram encaminhadas ao Laboratório de Histotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas, no Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo, para serem fixadas em formalina a 10% para posterior inclusão em parafina, preparação da lâmina e coloração por Gomori-Grocott.

### 3.10.5 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC)

Após 15 dias de infecção foi realizado o sacrifício dos animais, e a metodologia descrita anteriormente foi empregada, item 3.8.1.5.

### 3.10.6 Detecção e quantificação de citocinas

A detecção de diferentes citocinas foi realizada quantitativamente pelo método de ELISA, conforme instruções do fabricante (BD-PharMingen, EUA).

## **3.11 Avaliação da atividade *in vitro* de anticorpos monoclonais gerados contra Hsp60 derivada de *Histoplasma capsulatum* na infecção experimental por *P. lutzii***

### 3.11.1 Fagocitose

Foram realizados experimentos de fagocitose, de acordo ao protocolo anteriormente descrito, item 3.6.1, com duas concentrações dos anticorpos monoclonais, 7B6 e 4E12, 10  $\mu\text{g/ml}$  e 50  $\mu\text{g/ml}$ .

### **3.12 Uso de hospedeiro inveterbrado, *Galleria mellonella*, como alternativa no uso de animais de experimentação**

#### 3.12.1 Espécies e condições de cultivo

As leveduras *H. capsulatum* G184 e *P. lutzii* foram crescidas em caldo Sabouraud a 37 °C, sob agitação constante por três dias. A densidade celular foi determinada através de Câmara de Neubauer, pelo método de exclusão por azul de trypan.

#### 3.12.2 Infecção

Larvas de *Galleria mellonella*, adquiridas em Vanderhorst Wholesale, Inc., St. Marys, Ohio, em sua fase final de estágio larval foram selecionadas por tamanhos similares e sem quaisquer pontos cinza em seu corpo para garantir a reprodutibilidade do experimento. Os grupos foram compostos por 20 larvas. A inoculação das leveduras foi realizada pela injeção no hemoceloma com 10 µl de PBS estéril contendo diferentes concentrações de *H. capsulatum* ou *P. lutzii* ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ ) na última proleg, descrito em (156). As inoculações foram realizadas com auxílio de micro seringa de Hamilton com um diâmetro da agulha de 0,75 mm. O grupo controle foi inoculado apenas com PBS e outro grupo controle sem qualquer manipulação, denominado Sham, foi realizado em paralelo como controle não tratado. Todas as larvas foram colocadas em placas de Petri estéreis e mantidas no escuro a 25 °C e a 37 °C. As taxas de mortalidade foram determinadas diariamente. A morte da larva foi avaliada pela falta de movimento em resposta à estímulos mecânicos. Os ensaios foram realizados em quatro experimentos independentes. As curvas de sobrevivência e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o Log-rank (Mantel-Cox) teste de sobrevivência do Graph Pad Prism 5 (La Jolla, CA, EUA).

#### 3.12.3 Histopatológico

Larvas de *G. mellonella* infectadas com diferentes concentrações de *P. lutzii* e não infectadas (três por grupo) foram fixadas por imersão em 4% formalina

tamponada após três dias da infecção. As larvas foram cortadas longitudinalmente, dividindo-as em duas peças idênticas, e imersas em etanol a 70%. Os cortes foram incorporados em parafina e corados pelo método Ácido-Periódico Schiff (PAS) para exame microscópico, a confecção das lâminas foi realizada no Albert Einstein Cancer Center: Histopathology Facility. As estruturas como granulomas contendo leveduras internas foram contadas utilizando o programa Image Pro Plus 4,0, EUA.

#### 3.12.4 Determinação da carga fúngica em *G. mellonella*

Quatro larvas inoculadas foram homogeneizadas em 4 ml de PBS e alíquotas de 100  $\mu$ l desta solução foram plaqueadas em ágar BHI contendo penicilina estreptomicina (0,1 e 1%) para evitar o supercrescimento bacteriano. Este experimento foi realizado para todas as concentrações de *P. lutzii* e *H. capsulatum* citadas acima. As placas foram cultivadas a 37 °C por até 5 dias. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes.

#### 3.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5.0, utilizando-se ANOVA seguido de comparações de acordo com Tukey e *ttest*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise de monossacarídeos totais de diferentes isolados de *P. brasiliensis* por cromatografia gasosa (GC)

Realizamos a quantificação de monossacarídeos totais após a extração alcalina de diferentes isolados de *P. brasiliensis* porque nesse estudo utilizamos componentes derivados desse tipo de extração da levedura Pb18 e os demais isolados foram usados para comparação.

As amostras polissacarídicas hidrolisadas e acetiladas de *P. brasiliensis* dos isolados ED01, 01 (atualmente em processo de reconhecimento como nova espécie classificada como *P. lutzii*), 03, 18, 192, 339 e 1578, foram identificadas na forma de seus derivados hexacetilados por cromatografia a gás. As proporções dos monossacarídeos por cada isolado de *P. brasiliensis* estão listadas na tabela 2, abaixo. Os números na tabela representam as proporções em percentagem de cada monossacarídeo encontrado em diferentes isolados de *P. brasiliensis*.

**Tabela 2** - Perfil monossacarídeo de diferentes isolados de *P. brasiliensis*.

%	Acetato de arabinitol	Xilitol	Manitol	Galactitol	Glucitol
PbED01	2	5	20	11	62
Pb01	3	0	39	18	40
Pb03	4	12	28	8	48
Pb18	0	0	11	7	79
Pb192	1	1	69	25	4
Pb339	2	6	60	7	25
Pb1578	3	9	19	8	61

O isolado 192 é avirulenta e a que possui menor quantidade de glucitol, ou seja, glucose e a maior quantidade de galactose e manose. Os produtos analisados estavam como alditóis, os quais se referem as suas respectivas hexoses, exceto acetato de arabinitol, o qual é um álcool da classe polioliol, contendo múltiplos grupos hidroxila. Para os açúcares a correspondência é xilitol - xilose; manitol – manose;

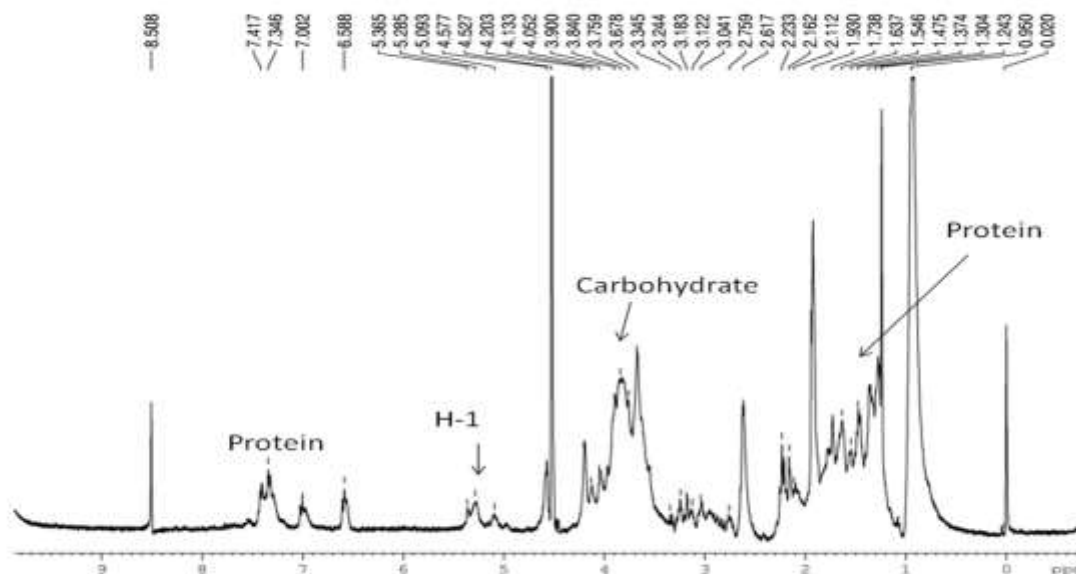


galactitol – galactose; glucitol – glucose. No isolado 18 foi encontrado ainda 2,3% de N-acetil-glucosamina, derivado da glucose, perfazendo no total 81,3% de glucose na parede celular, o maior índice de glucose encontrado dentre os isolados avaliados.

#### **4.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) da amostra extraída por hidrólise alcalina de *P. brasiliensis* (isolado 18)**

A ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono 13 foi realizada dissolvendo a amostra derivada da extração alcalina de Pb18 em solução de óxido de deutério, a análise foi efetuada em espectrômetro Micromass Quattro LC. A análise de metilação mostrou unidades finais não reduzidas de fucose, manose, galactose e glucose com unidades de manose 2-O substituídas, nas proporções 25:11:28:9:25, consistente com uma estrutura glicoproteica. A parte de carboidratos se assemelha a glicoproteína de 55 kDa, derivada de *P. brasiliensis*, isolado 339 (70). O cromatograma (figura 3) exhibe proteínas, uma pequena região H-1, com 3 sinais, 4.527, 4.203 e 4.133 p.p.m e a porção de carboidrato. A extração com KOH é uma técnica para extração de polissacarídeos, e podemos verificar que temos uma glicoproteína como produto, talvez a técnica não tenha sido eficiente, ou que as proteínas presentes na amostra estejam mascaradas devido à conformação da molécula, sendo mais difícil para acessá-la durante a extração. Portanto a extração polissacarídica de *P. brasiliensis*, nos levou a um antígeno de natureza glicoproteica e não polissacarídica somente.

**Figura 3** - Cromatograma referente à análise da amostra extraída por hidrólise alcalina de *P. brasiliensis*, isolado 18.



Fonte: Philip Albert James Gorin, 2011.

#### 4.3 Dosagem de proteínas e açúcares totais de *P. brasiliensis* (isolado 18)

A dosagem de proteínas e açúcares totais foi realizada pelo método de Bradford e Dubois, respectivamente. A amostra derivada da extração alcalina do fungo *P. brasiliensis* (isolado 18) apresentou 48,95% e 51,05%, de proteínas e açúcares, respectivamente. No entanto, foi possível observar em todas as extrações, que as amostras apresentaram duas frações: solúvel e insolúvel em água. Sendo que as frações solúveis foram dosadas e as frações insolúveis não foram analisadas devido à sua insolubilidade. Os resultados das dosagens representam a média de três extrações.

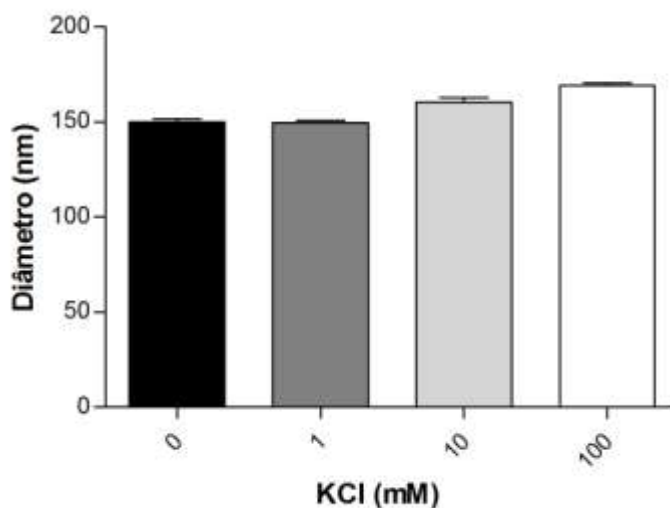
#### 4.4 Determinação do potencial zeta da amostra derivada da extração alcalina de *P. brasiliensis* (isolado 18)

O antígeno glicoproteico da isolado 18 foi analisado quanto ao seu potencial zeta, na figura 4 podemos observar que nas quatro molaridades de KCl usado, o diâmetro da amostra não se alterou, permanecendo em torno de 150 nm.

O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, a interação entre as partículas se dá pela magnitude do potencial zeta

e não pela sua carga de superfície. Dessa forma podemos prever a estabilidade das suspensões coloidais. Esses experimentos foram feitos para avaliar a estabilidade da glicoproteína de Pb18. Na figura 5 podemos observar que independente da molaridade do KCl usado, o perfil foi bem similar, com resultados de 0 a -30 mV, o qual é representativo de moléculas estáveis. O maior número de informações sobre essa glicoproteína é de grande interesse, já que até o presente momento não encontramos na literatura referência a ela, e todas as hidrólises alcalinas realizadas deram como produto essa glicoproteína em larga escala.

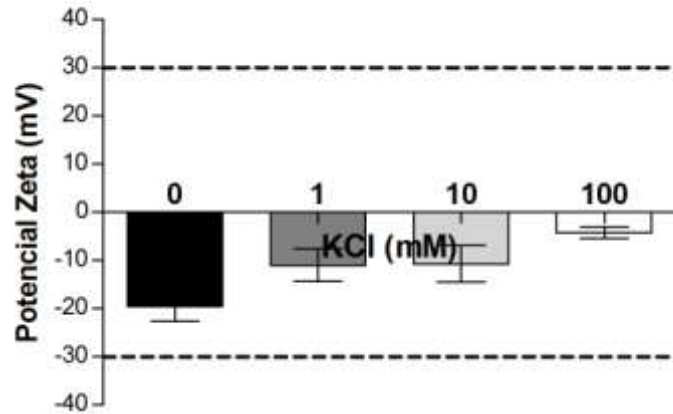
**Figura 4** - Diâmetro médio das moléculas da amostra extraída por hidrólise alcalina de *P. brasiliensis*, isolado 18 em solução de KCl em 0, 1, 10 e 100 mM.



As barras indicam a média de três leituras.

Fonte: Thomaz, 2012.

**Figura 5** - Potencial Zeta da amostra extraída por hidrólise alcalina de *P. brasiliensis*, isolado 18, em solução de KCl em 0, 1, 10 e 100 mM.



As barras indicam a média de três leituras.

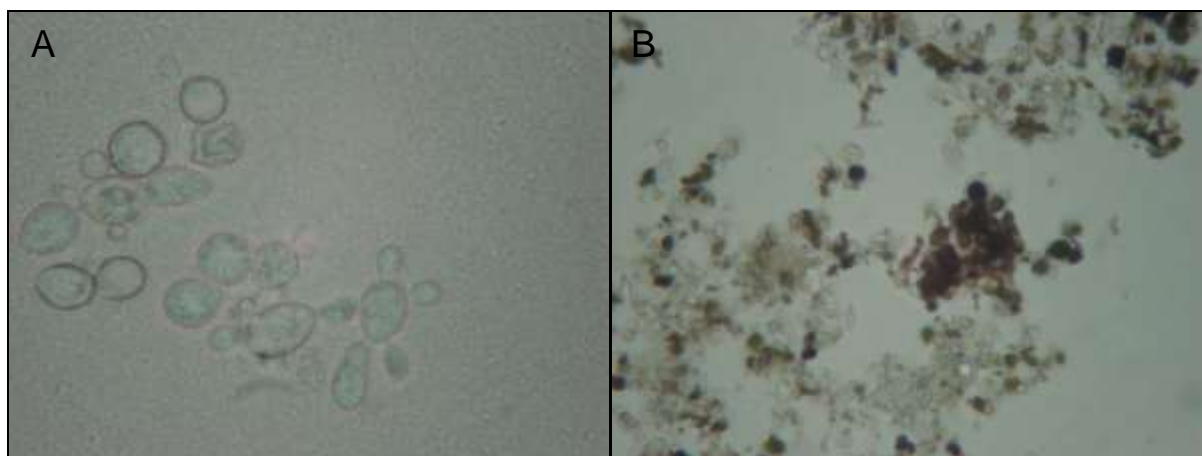
Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.5 Cultivo de *P. brasiliensis* na presença e na ausência de L-DOPA

As leveduras de *P. brasiliensis*, isolado 18, foram cultivadas em meio quimicamente definido e suplementado com L-DOPA por 15 dias a temperatura de 37 °C sob agitação constante, decorrido este período observou-se nos frascos enegrecimento do meio, bem como por microscopia óptica a presença de células com pigmentos escurecidos (figura 6B).

O cultivo de *P. brasiliensis* na ausência de L-DOPA (figura 6A) apresentou, na microscopia óptica, leveduras sem pigmentação.

**Figura 6** - Fotomicrografia óptica (aumento de 1000x) de *P. brasiliensis* cultivados na ausência (A) e presença (B) de L-DOPA.



Fonte: Thomaz, 2012.

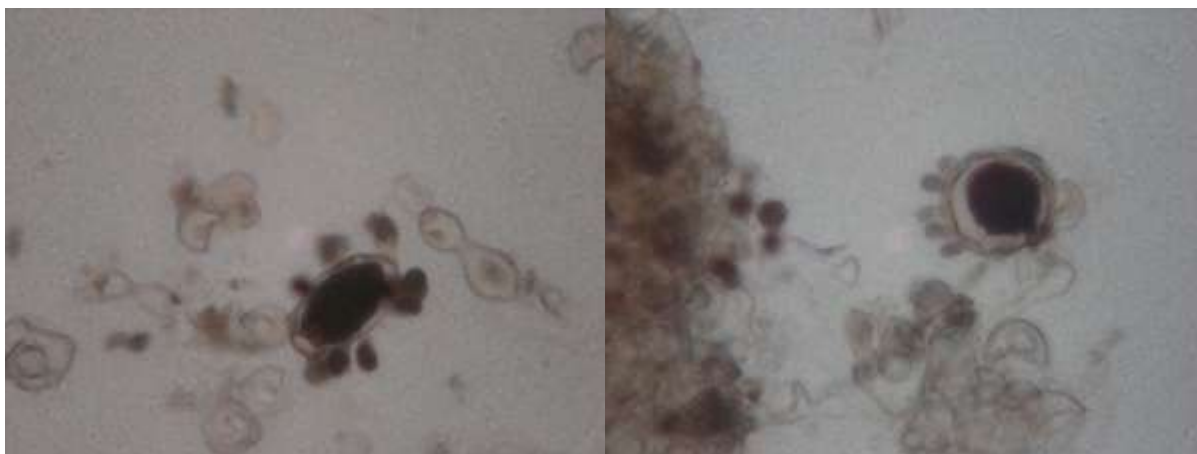
#### 4.5.1 Extração e purificação das partículas de melanina

As leveduras melanizadas foram tratadas com enzimas que contém atividade de celulase, protease e quitinase e ainda submetidas a agentes desnaturantes bem como digestão com ácido produzindo partículas enegrecidas, semelhantes à melanina “ghost”, conforme descrito por Gomez e outros (43) (Figura 7).

O produto deste tratamento é denominado “melanina ghosts”, já que esta molécula é depositada na parede celular e membrana do fungo, sendo isolada com o mesmo tamanho e forma da estrutura original da levedura.

As leveduras de *P. brasiliensis* não melanizadas que foram submetidas ao mesmo tratamento descrito acima foram completamente solubilizadas (dados não mostrados).

**Figura 7** - Fotomicrografia óptica (aumento de 1000x) de melanina “ghost” proveniente de *P. brasiliensis*.

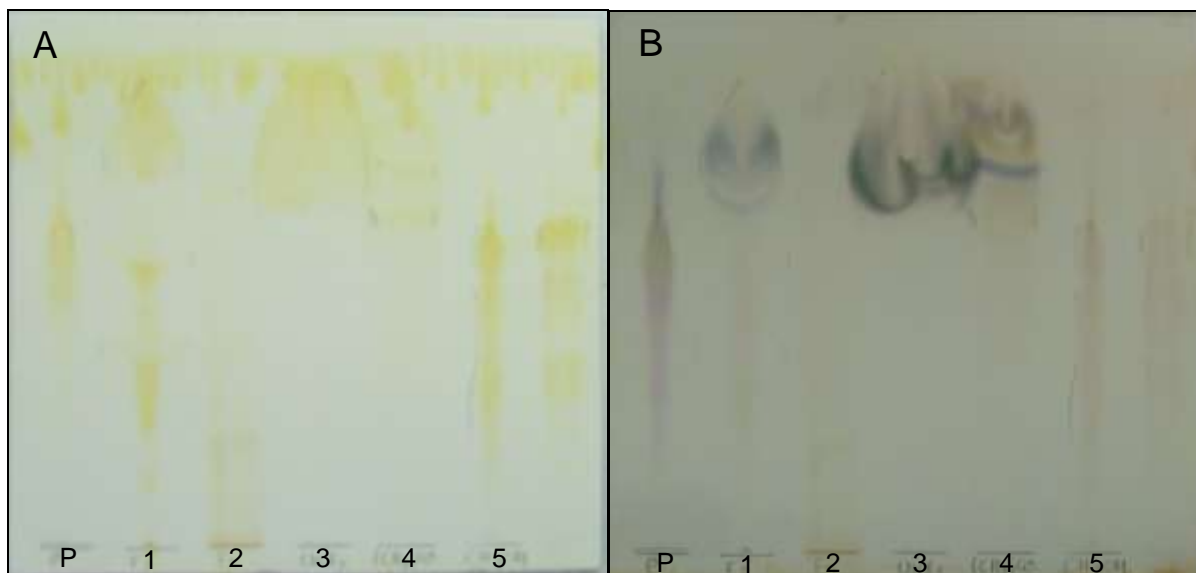


Fonte: Thomaz, 2012.

#### **4.6 Preparação das células de *P. brasiliensis* para a extração de glicolípideo bruto**

Para a extração de lipídios brutos, *P. brasiliensis*, isolado 18, foi cultivado em meio Sabouraud enriquecido com extrato de levedura com o objetivo de aumentar massa celular sem interferir em sua composição, a temperatura de 37 °C, sob agitação constante. Após o período de crescimento, as células foram delipidadas com solventes orgânicos, obtendo assim lipídio bruto total, o qual foi usado posteriormente para a extração do glicolípido neutro. É possível verificar na figura 8 mobilidade cromatográfica semelhante ao padrão nas amostras 4 e 5.

**Figura 8** - Cromatografia em camada delgada das fases provenientes da partição de Folch e do fracionamento da fase inferior de Folch em sílica gel 60, com os solventes: clorofórmio, acetona e metanol.



O solvente de corrida utilizado foi  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (clorofórmio/metanol/água), nas proporções 65:25:4 (v/v/v) e revelada com vapores de iodo (A) e 0,5% de orcinol em 3 M de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (B). Os glicolipídios apresentam um padrão de cor roxa.

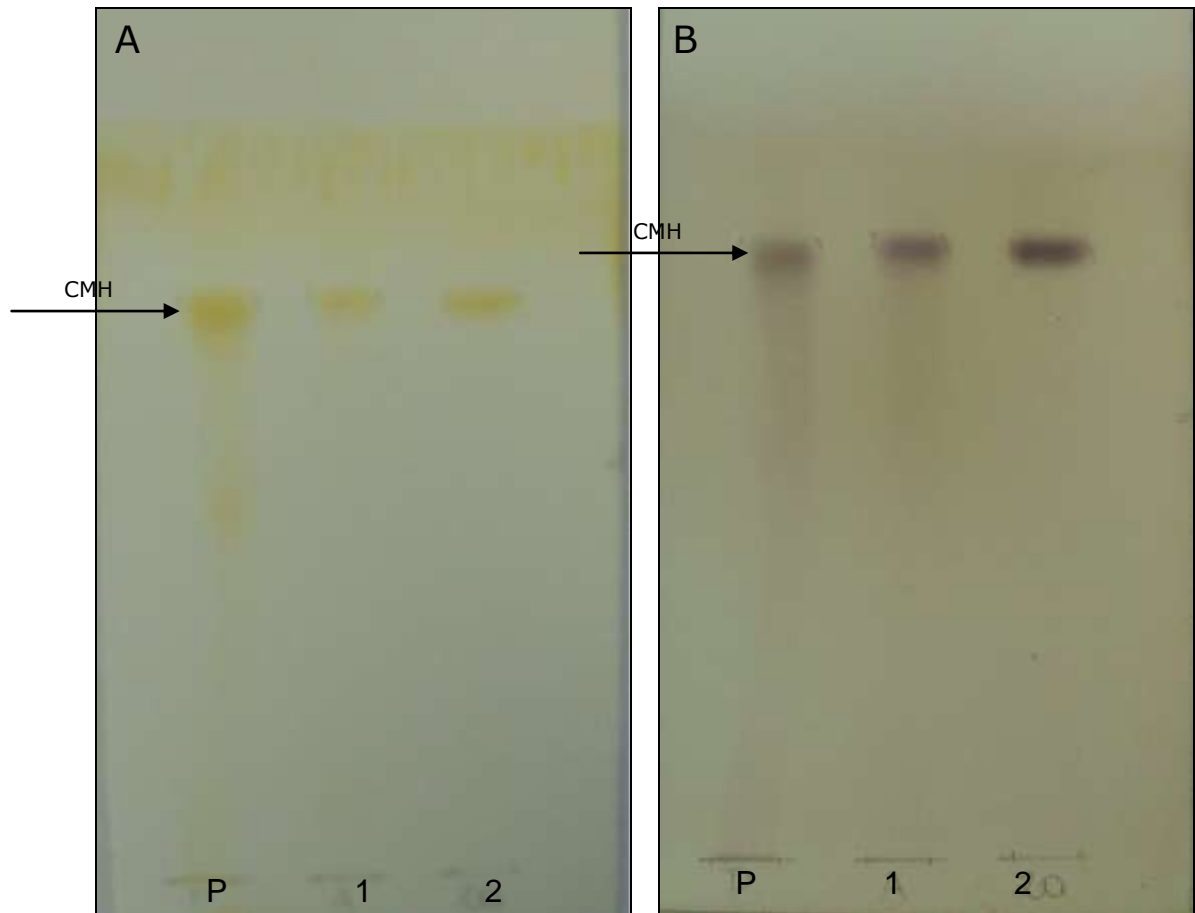
- (P) padrão de CMH
- (1) Fase inferior de Folch
- (2) Fase superior de Folch
- (3) Fração clorofórmio
- (4) Fração acetona
- (5) Fração metanol

Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.6.1 Extração de glicolípido neutro (monohexosilceramida - CMH) de *P. brasiliensis*

Para a purificação de CMH, o extrato lipídico bruto foi fracionado conforme técnica de Folch e, purificado novamente em nova coluna de sílica gel 60. Para verificar a pureza das amostras foi realizado cromatografia em camada delgada, utilizando como referência padrão de CMH (Figura 9). As diferentes partições obtidas foram agrupadas em uma fração única para imunização dos camundongos.

**Figura 9** - Cromatografia em camada delgada do CMH purificado a partir do extrato lipídico bruto de *P. brasiliensis*.



O solvente de corrida utilizado foi  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (clorofórmio/metanol/água), nas proporções 65:25:4 (v/v/v) e, revelada com vapores de iodo (A) e 0,5% de orcinol em 3M de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (B). Os glicolípidios apresentam um padrão de cor roxa.  
 (P) padrão de CMH  
 (1) amostra purificada  
 (2) amostra purificada

Fonte: Thomaz, 2012.

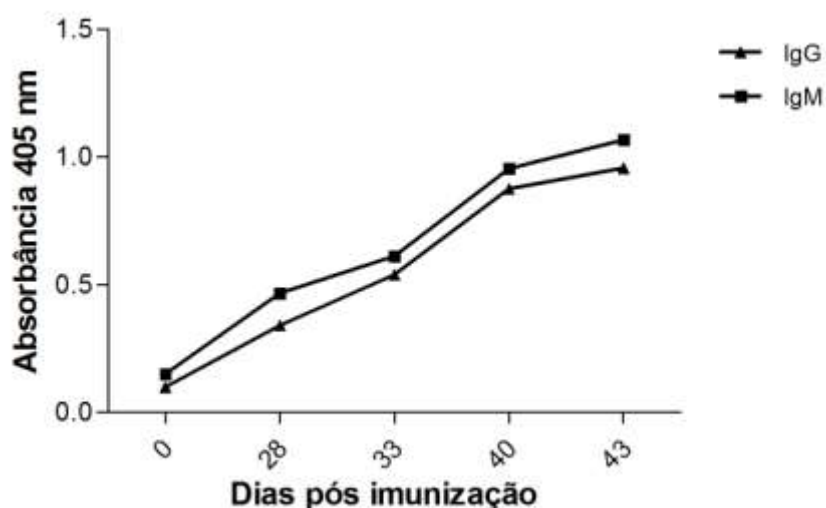
#### 4.7 Imunização dos camundongos com CMH

Foram realizados dois protocolos de imunização com CMH e foi possível padronizar o ensaio com o protocolo 1, conforme figura 10, utilizando apenas adjuvante de Freund completo e incompleto em todas as imunizações. Quando utilizado alumen (protocolo 2) os animais não produziram título de anticorpos por ELISA acima de 0,4 de densidade óptica na diluição de 1:6400. O protocolo 2 foi



realizado pois atualmente têm se buscado alternativas para o uso do adjuvante de Freund, pois não é permitido o uso em seres humanos, diferentemente de alumen, cujas novas preparações vacinais priorizam seu uso. Observamos que quando realizado mais de 5 imunizações os animais apresentam anergia ao antígeno, sendo descartado para utilização da produção dos hibridomas (dados não mostrados).

**Figura 10** - Perfil de IgG e IgM no período de imunização com CMH em camundongos BALB/c.

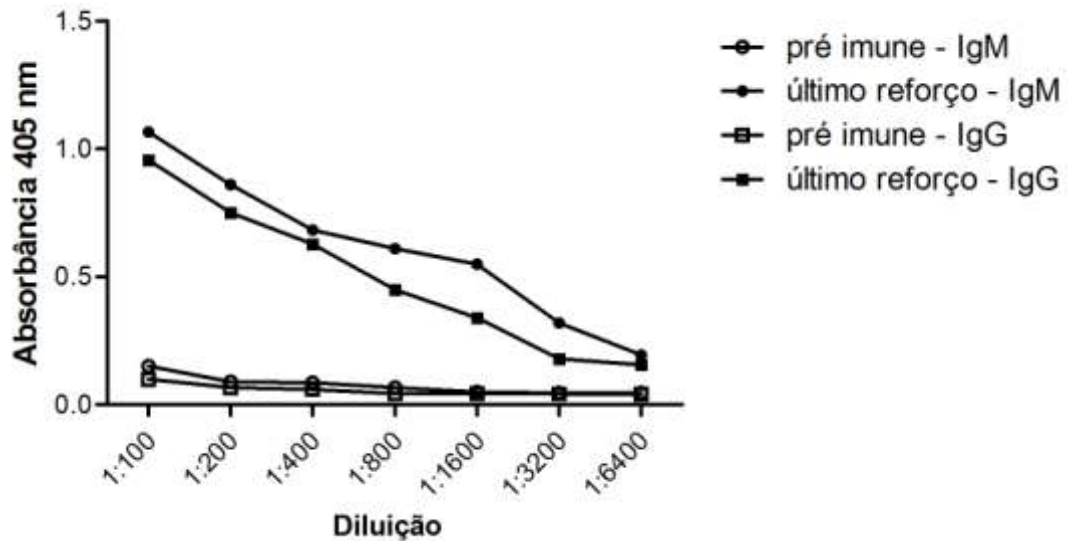


O gráfico representa média dos soros diluídos 1:100 dos animais utilizados.

Fonte: Thomaz, 2012.

Na figura 11 podemos observar o título de anticorpos, no último reforço, em diferentes diluições do camundongo imunizado com CMH que apresentou maior concentração de imunoglobulinas do isotipo G e M. Na maior diluição - 1:6400 - o título das imunoglobulinas, tanto IgG como IgM, foram superiores aos soros pré-ímmunes, esse resultado demonstra que o animal possui uma quantidade adequada de anticorpos contra CMH para utilizar na fusão celular, como é preconizado na literatura.

**Figura 11** - Perfil de IgG e IgM em diluições seriadas, no último dia de imunização com CMH em camundongos BALB/c.



O gráfico representa o animal que obteve maior concentração de anticorpos para ambos os isotipos.

Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.8 Imunização dos camundongos com melanina

Foram realizados dois protocolos de imunização com melanina e foi possível padronizar o ensaio com o protocolo 1, conforme figura 12, utilizando apenas adjuvante completo e incompleto de Freund em todas as imunizações. Quando utilizado alumen (protocolo 2) os animais produziram baixa quantidade de anticorpos por ELISA, menor que 0,4 de densidade óptica, no dia 28, na maior diluição avaliada.

**Figura 12** - Perfil de IgG e IgM no período de imunização com melanina em camundongos BALB/c.

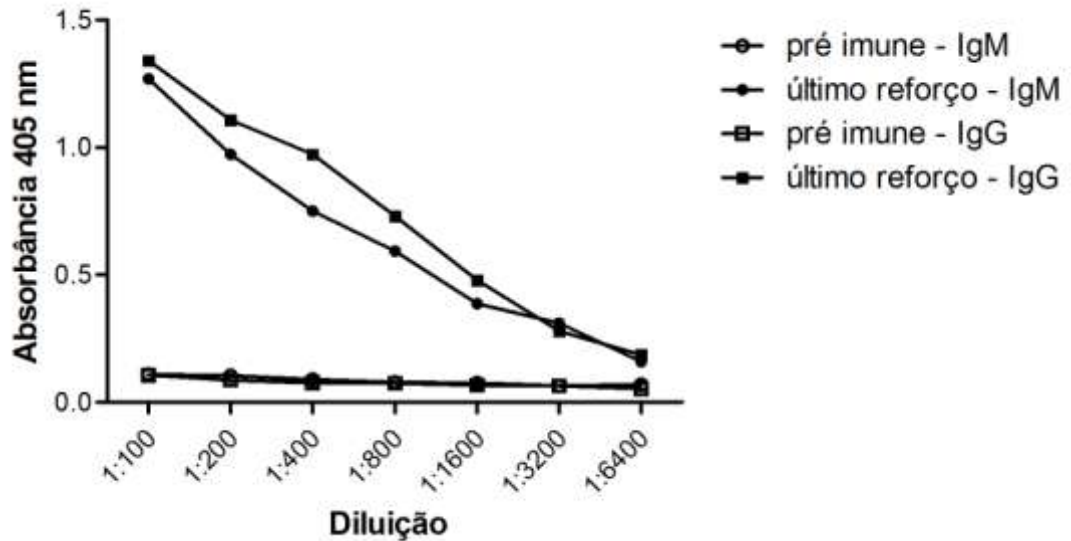


O gráfico representa média dos soros diluídos 1:100 dos animais utilizados.

Fonte: Thomaz, 2012.

Na figura 13 podemos observar o título de anticorpos em diferentes diluições do camundongo imunizado com melanina que apresentou maior concentração de imunoglobulinas do isotipo G e M. Na maior diluição - 1:6400 - o título das imunoglobulinas, tanto IgG como IgM, foram superiores aos soros pré-ímenes, esse resultado demonstra que o animal possui uma quantidade adequada de anticorpos contra melanina para utilizar na fusão celular, como é preconizado na literatura.

**Figura 13** - Perfil de IgG e IgM em diluições seriadas, no último dia de imunização com melanina em camundongo BALB/c..



O gráfico representa o animal que obteve maior concentração de anticorpos ambos os isotipos

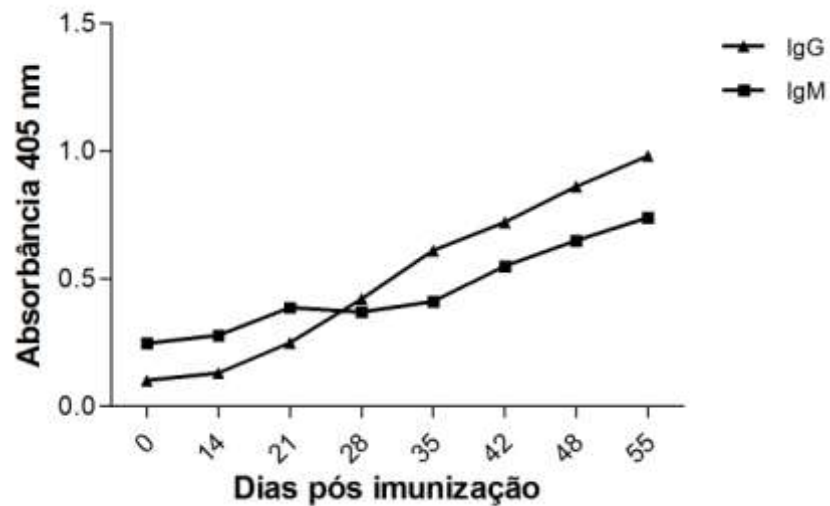
Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.9 Imunização dos camundongos com antígeno glicoproteico de *P. brasiliensis* (isolado 18)

Foram realizados seis protocolos de imunização com antígeno glicoproteico extraído da parede celular de Pb18, os protocolos 1 e 2, com Alumen e Freund completo e incompleto como adjuvantes não foram eficientes, não estimularam a produção de anticorpos nos camundongos BALB/c (dados não mostrados).

No entanto, como mostra a figura 14, o protocolo de número 3, exibiu a maior eficiência, com o adjuvante Quil A, uma saponina extraída de casca de árvore, *Quillaja saponaria* Molina.

**Figura 14** - Perfil de IgG e IgM no período de imunização com antígeno glicoproteico, homogeneizado com o adjuvante derivado de saponina, Quil A, derivado de *P. brasiliensis* em camundongos BALB/c.

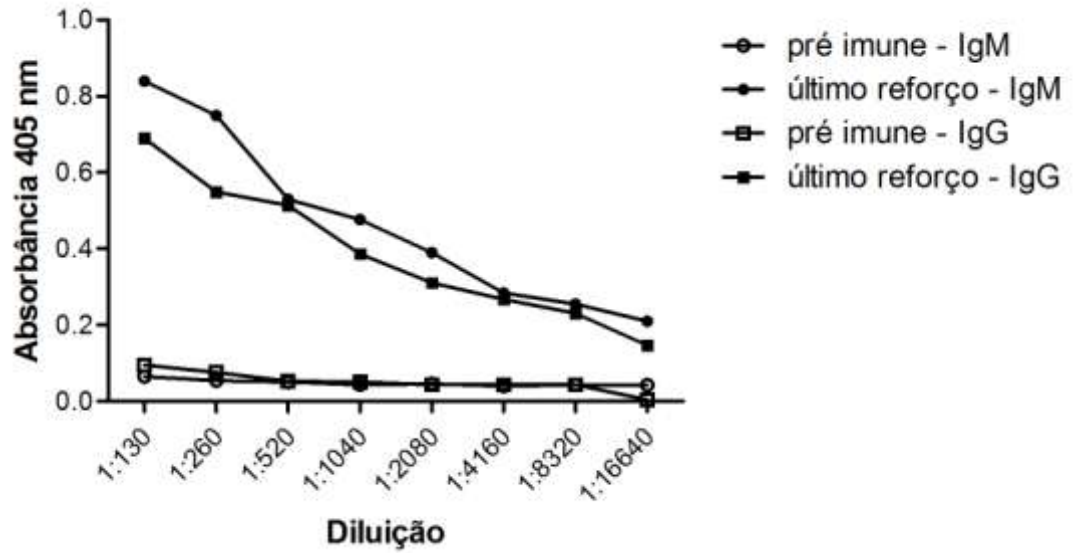


O gráfico representa média dos soros diluídos 1:100 dos animais utilizados.

Fonte: Thomaz, 2012.

Na figura 15, podemos observar o título de anticorpos em diferentes diluições do camundongo imunizado com glicoproteína que apresentou maior concentração sérica de imunoglobulinas, tanto IgG como IgM, em diferentes diluições. Podemos observar que os índices são superiores ao soro pré-imune do mesmo animal.

**Figura 15** - Perfil de IgG e IgM em diluições seriadas, no último dia de imunização com glicoproteína derivada de *P. brasiliensis* em camundongo BALB/c.

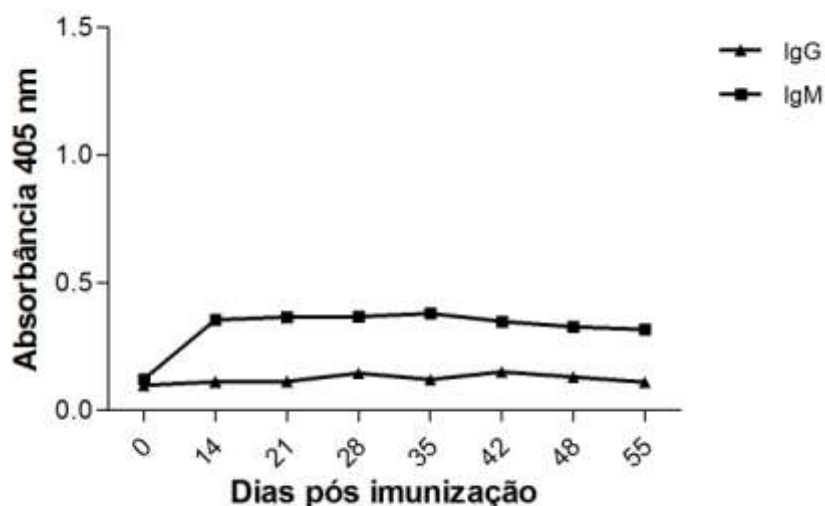


O gráfico representa o animal que obteve maior concentração de anticorpos para ambos os isotipos.

Fonte: Thomaz, 2012.

O protocolo 5, cujo agente conjugador foi KLH, na primeira imunização apresentou ligeiro aumento de anticorpo, mas no decorrer das seguintes imunizações os títulos tiveram queda drástica, conforme demonstrado na figura 16.

**Figura 16** - Perfil das concentrações séricas de IgG e IgM de camundongos BALB/c imunizados com o antígeno glicoprotéico derivado de *P. brasiliensis* conjugado com KLH e emulsificados com adjuvante de Freund.



O gráfico representa uma média dos soros diluídos 1:100 dos animais utilizados.

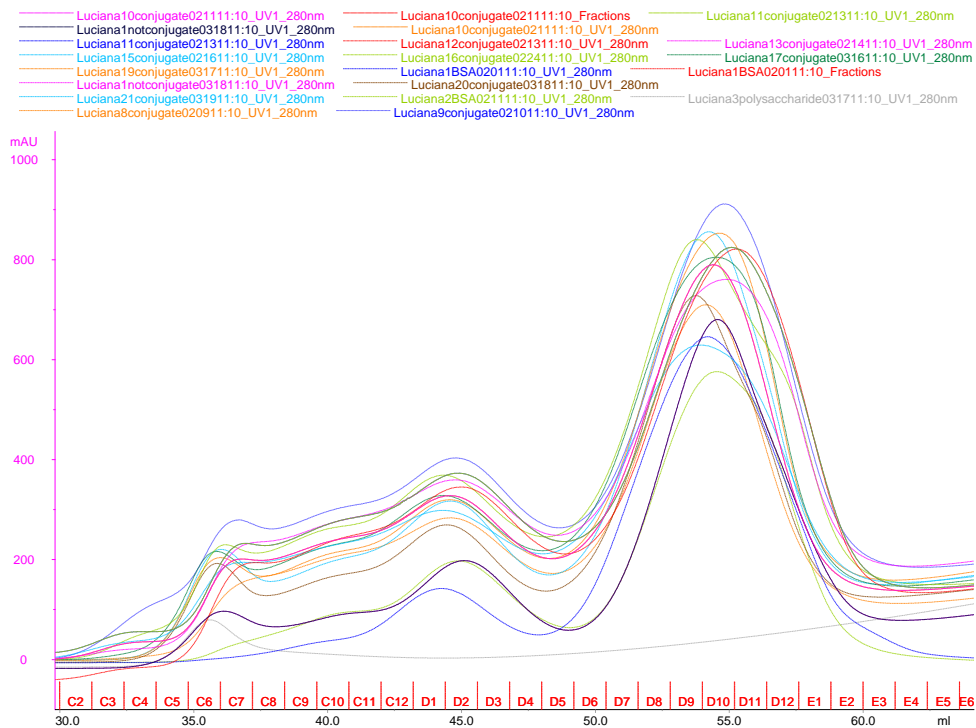
Fonte: Thomaz, 2012.

Como o protocolo 6 utilizava leveduras autoclavadas, os animais, teoricamente, reconheceriam uma diversidade de antígenos, não somente a molécula alvo de interesse, porém, no ensaio de ELISA, para detectar reatividade com o antígeno de interesse, os soros não titularam, e quando modificamos o ELISA, sensibilizando com as leveduras autoclavadas em diferentes concentrações, obtivemos os mesmos níveis de imunoglobulinas, IgG e IgM (dados não mostrados).

#### 4.9.1 Conjugação do antígeno glicoproteico derivado da extração alcalina de *P. brasiliensis* (isolado 18), à proteína de BSA e sua purificação

Foram realizadas 26 conjugações da glicoproteína com o BSA, usando como agente ativador dos grupos, CDAP. No entanto, de alguma forma a fusão entre a glicoproteína-proteína não ocorreu, as alterações do protocolo não alcançou sucesso. Na figura 17 podemos observar os picos de algumas das conjugações, a linha preta representa o controle, todos os reagentes exceto CDAP, sem a conjugação, o perfil entre todos os picos foram semelhantes.

**Figura 17 - Cromatograma referente á análise da amostra glicoproteica, extraída de *P. brasiliensis*, conjugada com BSA.**



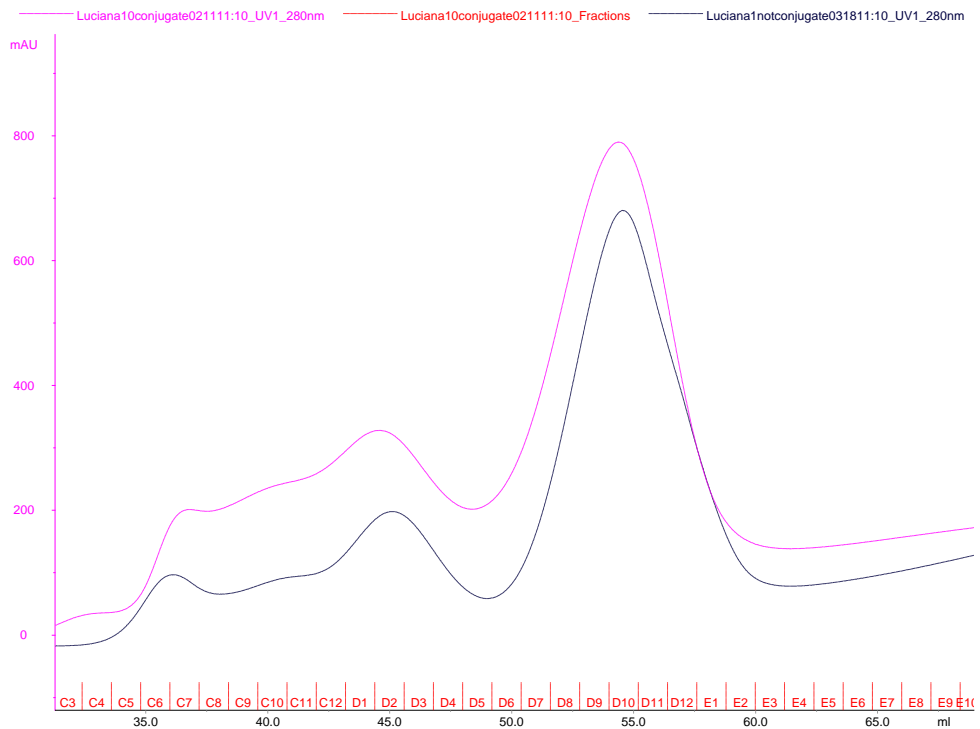
Linha preta: representa o controle com todos os reagentes, exceto o CDAP.

Fonte: Thomaz, 2012.

A figura 18 representa cromatograma de uma única conjugação, a linha rosa indica o produto hipoteticamente conjugado, e a linha preta, não conjugado – com todos os reagentes, exceto CDAP. Não apareceram picos adicionais, o que representa que não houve conjugação, haja visto que o produto conjugado apresentaria peso molecular maior, e consequentemente seu pico apareceria antes. Independentemente da conjugação vimos uma pequena diferença de intensidade entre os picos das frações C6, C7, D2, D10 e D11, essas frações foram dosadas por Bradford e Dubois, e houve um discreto aumento no rendimento proteico, embora, muito pequeno. Utilizamos essas frações nas imunizações. As frações foram concentradas em Ultra Amicon, cut off de 3K (Millipore). No entanto, o protocolo de imunização não funcionou. A figura 19 mostra somente o antígeno glicoproteico – sem nenhum dos reagentes utilizado na conjugação.

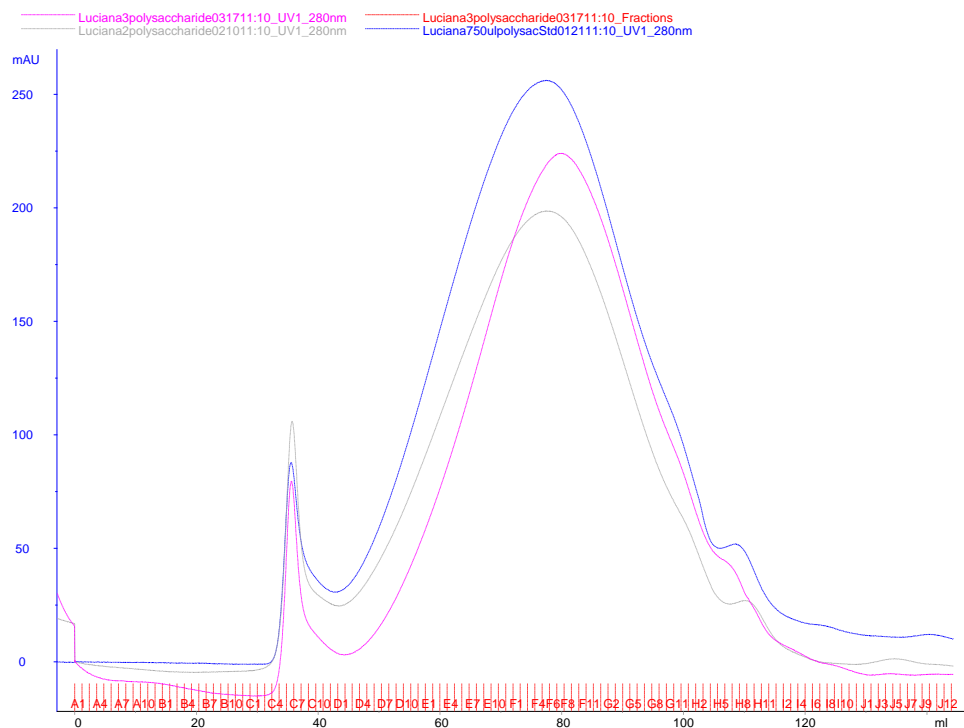


**Figura 18** - Cromatograma referente à análise da amostra glicoproteica, extraída da de *P. brasiliensis*, conjugada e não conjugada com BSA.



Fonte: Thomaz, 2012.

**Figura 19** - Cromatograma referente à análise da amostra glicoproteica, extraída de *P. brasiliensis*.



Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.10 Produção de anticorpos monoclonais contra CMH

Dos camundongos que foram imunizados com CMH e que apresentaram os maiores títulos de imunoglobulinas, IgG e IgM, foram retirados os linfonodos e o baço, para isolar os anticorpos específicos contra o glicolípido neutro – CMH.

Foram realizados 7 protocolos da técnica de fusão utilizando como antígeno CMH.

O protocolo 1 foi realizado três vezes, a primeira vez, os poços contendo hibridomas que foram reativos por ELISA e, apresentaram absorvância maior ou igual a 1, na diluição de 1:100, que totalizaram 8, foram selecionados para diluição limitante, para que uma única célula se multiplique e dê origem a um único clone. Durante essa diluição, os hibridomas entraram em quiescência por quase 3 meses, ou seja, fase  $G_0$  de crescimento, onde as células abaixam seu metabolismo e reduzem drasticamente a síntese de macromoléculas. Para saírem desta fase as células necessitam de estímulos que podem ir de mecânicos à químicos, dependendo da linhagem celular, no entanto, para hibridomas estes fatores são específicos, e podendo variar de acordo com a linhagem do hibridoma e a placa de cultura utilizada. Foram utilizados quatro diferentes meios de cultura (Hibridoma, Opti-MEM, D-MEM e RPMI) todos suplementados com fatores de crescimento, como aminoácidos não essenciais, essenciais, glutamina, complexo vitamínico, hepes e piruvato de sódio; dentre estes, o meio que conseguiu retirar as células da fase quiescente foi RPMI suplementado, porém, sem glutamina. Os sobrenadantes dos poços com os hibridomas foram coletados e armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Decorrido alguns dias após as células voltarem a crescer elas morreram durante a expansão para placa com maior quantidade de poços.

Na segunda tentativa, para eliminar esse problema, durante a expansão foi acrescentado 20% de soro fetal bovino, como fator de crescimento, porém, as células morreram mesmo com aumento no fator de crescimento. No entanto, foram armazenados os sobrenadantes de cultura de inúmeras trocas de meio, com alta reatividade por ELISA e unidos com os sobrenadantes anteriores. Nessa amostra de sobrenadante há imunoglobulinas monoespecíficas contra CMH, as quais foram purificadas por PVDF, conforme descrito no item 3.5.2.4 em Materiais e Métodos. E, na terceira tentativa desse protocolo não obtivemos reprodutibilidade, não ocorreu fusão, pois as células não sobreviveram ao meio de seleção.

No protocolo 2 alteramos apenas a marca do meio, o qual é padronizado o uso em nosso laboratório com outras linhagens celulares como os macrófagos peritoneais (J774.16), no entanto as células não sobreviveram em meio de seleção.

No protocolo 3 acrescentamos HAT apenas 24 horas após fusão para reduzir a toxicidade. As células continuaram vivas após seleção e apresentaram reatividade por ELISA, mas pararam de crescer após expansão em placa de 24 poços, possivelmente na tentativa de expandir os clones, as células sofreram com o espaço intercelular, diminuindo o contato entre elas, o qual para esse tipo de células é dito de extrema importância, hibridomas usualmente crescem em rosetas e não separados.

No protocolo 4 aumentamos o tempo de exposição das células de mieloma e esplénocitos ao PEG para tentar melhorar a eficiência da fusão, mas não obtivemos células viáveis após seleção em meio com HAT.

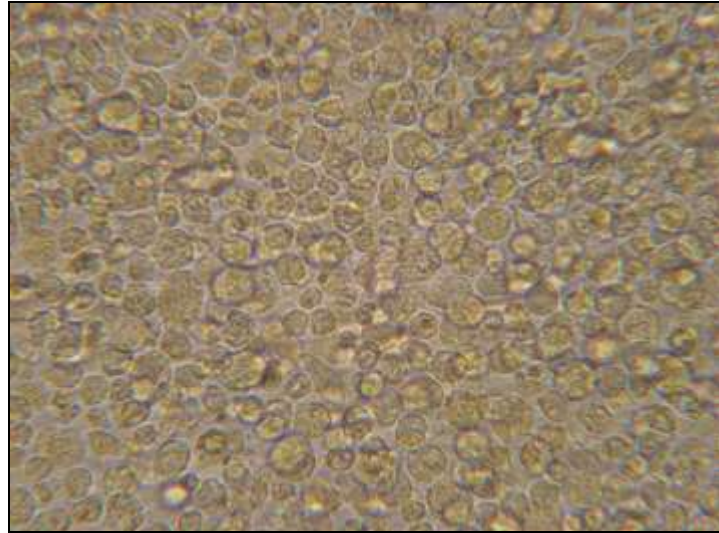
No protocolo 5 trocamos a concentração do PEG para verificar se a sua concentração está relacionada a toxicidade dos híbridos e, obtivemos clones, porém, não reativos por ELISA.

No protocolo 6 alteramos a proporção celular, mas não obtivemos clones.

No protocolo 7 adicionamos ao PEG, DMSO, usamos uma concentração intermediária de soro fetal bovino de todos os protocolos, inativando-o no mesmo dia do ensaio para eliminar eventuais dúvidas sobre contaminação por complemento, e através da injeção de meio de cultura no baço foi possível coletar somente esplénocitos, evitando o uso na fusão com possíveis debris celulares. Os meios de cultura, soro fetal e aminoácidos não essenciais foram todos da Gibco. Durante o processo de seleção, com HT, a aminopterina já retirada, apresentou reatividade por ELISA com 41 clones positivos. No entanto, mais uma vez, no processo de expansão para placa de 24 poços as células morreram.

A figura 20 mostra os hibridomas gerados contra CMH do protocolo 1, é possível observar macrófagos (células espalhadas), muitas células fusionadas (células redondas) e debris celular (estruturas arredondadas formadas por grânulos). E na figura 21, hibridomas gerados da segunda tentativa do protocolo 1, observamos diversos macrófagos espalhados e pouca células fusionadas.

**Figura 20** - Fotomicrografia óptica (aumento de 400x), em microscópio invertido (BIOVAL, SDS-1B), dos hibridomas contra CMH, gerados no protocolo 1.



Fonte: Thomaz, 2012.

**Figura 21** - Fotomicrografia óptica (aumento de 400x), em microscópio invertido (BIOVAL, SDS-1B), dos hibridomas contra CMH, gerados no protocolo 1.



Células fusionadas (flecha) e macrófagos espalhados.

Fonte: Thomaz, 2012.

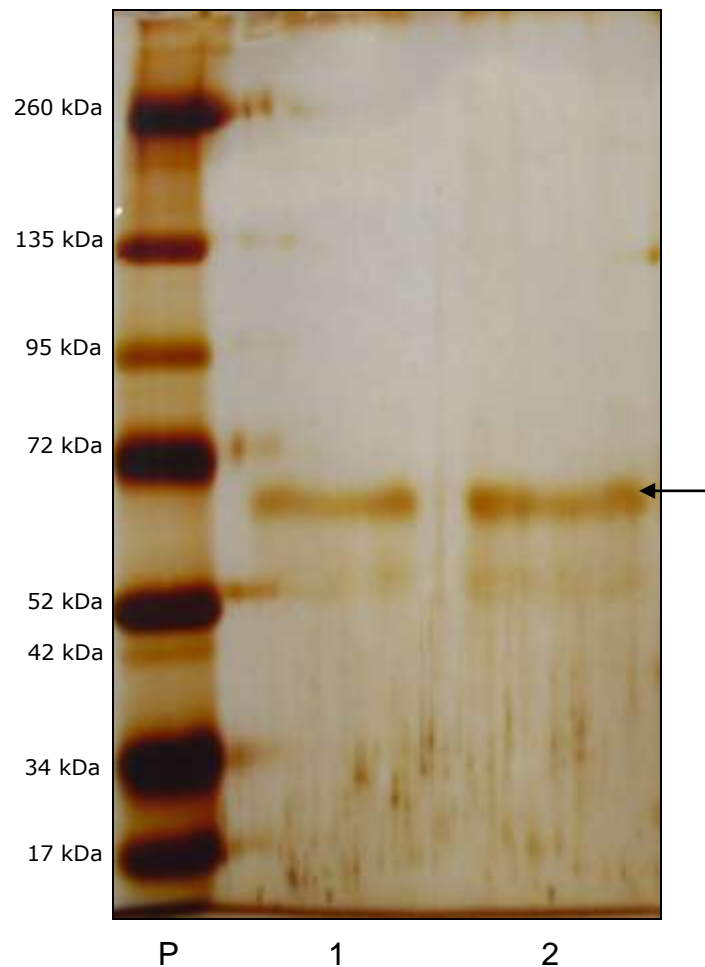
#### 4.10.1 Obtenção de imunoglobulinas de sobrenadante de cultura de hibridomas específicos para CMH

Os sobrenadantes de cultura, das fusões com CMH (protocolo 1) que foram reativos por ELISA foram coletados e armazenados a -20 °C. As imunoglobulinas presentes nos sobrenadantes de cultura dos hibridomas secretores de anticorpo contra CMH foram purificadas por afinidade em membrana de PVDF. A amostra eluída foi analisada por SDS-PAGE e verificado sua reatividade por ELISA, usando o conjugado IgG e IgM separadamente.

#### 4.10.2 SDS-PAGE

Para verificação do perfil proteico da purificação por PVDF do sobrenadante de cultura de hibridomas, foi realizada a técnica de SDS-PAGE e corado pela técnica da Prata, a amostra foi corrida em duplicata. É possível observar uma banda no gel de peso molecular de aproximadamente 65 kDa cujo peso é indicativo de um dos monômeros de IgM, cuja estrutura é pentamérica (figura 22).

**Figura 22** - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do eluído da purificação por PVDF de sobrenadante de cultura de hibridomas contra CMH.



(P) padrão de peso molecular  
(1) amostra do sobrenadante  
(2) amostra 1

Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.11 Obtenção de anticorpos monoclonais contra melanina

Foram realizados 5 protocolos para técnica de fusão utilizando como antígeno melanina.

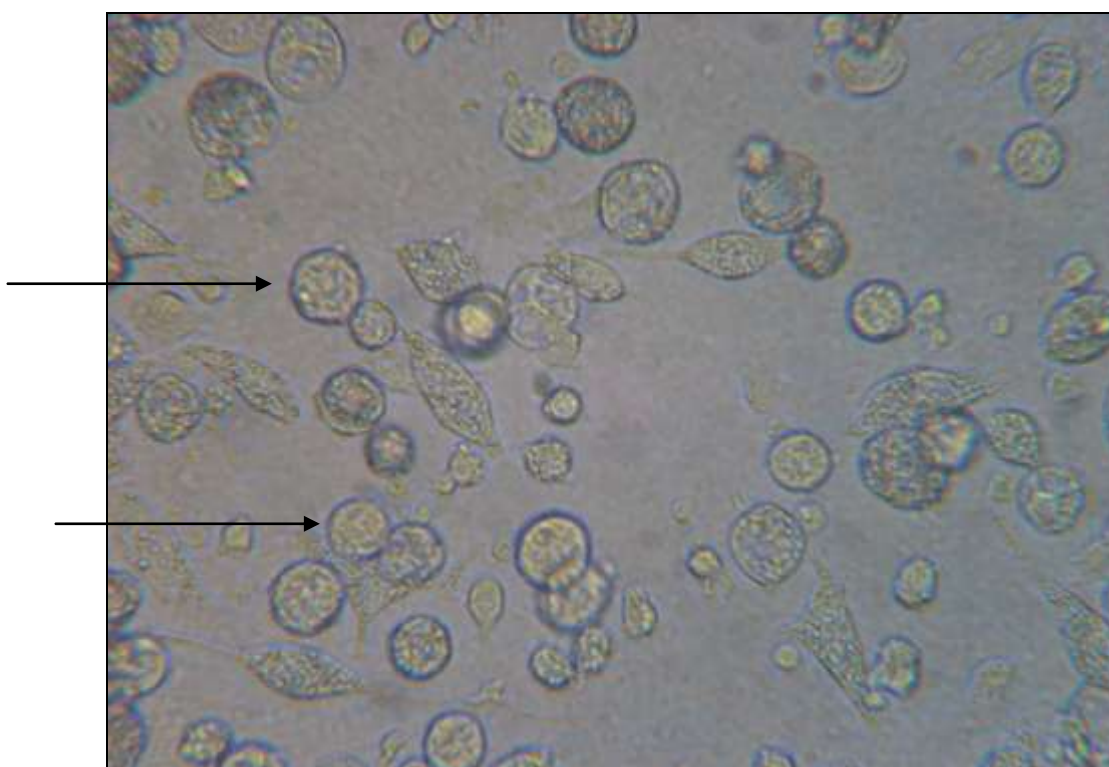
Nos protocolos 1 e 2 as células não sobreviveram ao meio de seleção, ou seja, não obtivemos clones.

No protocolo 3 provavelmente a proporção celular utilizada não foi adequada, pois não foi possível, 24 horas após fusão, visualizar uma única célula viva e grande quantidade de células mortas.

No protocolo 4 obtivemos clones de baixa reatividade por ELISA, com densidade óptica inferior a 0,2, na maior diluição analisada.

E, no protocolo 5 após o término do processo de seleção, foi possível visualizar clones viáveis e reativos por ELISA (células arredondadas, sem granulações, com parede íntegra), mas poucos macrófagos (células espidas) exibido na figura 23. No entanto quando as células passaram para diluição limitante elas não sobreviveram.

**Figura 23** - Fotomicrografia óptica (aumento de 400x), em microscópio invertido (BIOVAL, SDS-1B), dos hibridomas contra melanina, gerados no protocolo 5.



Células fusionadas (flecha) e macrófagos.

Fonte: Thomaz, 2012.

É possível observar que nas fusões com melanina, a concentração de 20% de soro fetal pode ter interferido nos clones, portanto alteramos para 15% no último protocolo realizado, como na fusão com CMH e, os clones ficaram sem granulações internas (formação de autofagossoma) e com paredes aparentemente resistentes. No entanto há similaridade nos efeitos do PEG de acordo com o tempo de

exposição, sendo um minuto o tempo máximo para obtenção de clones específicos e inespecíficos durante a fusão.

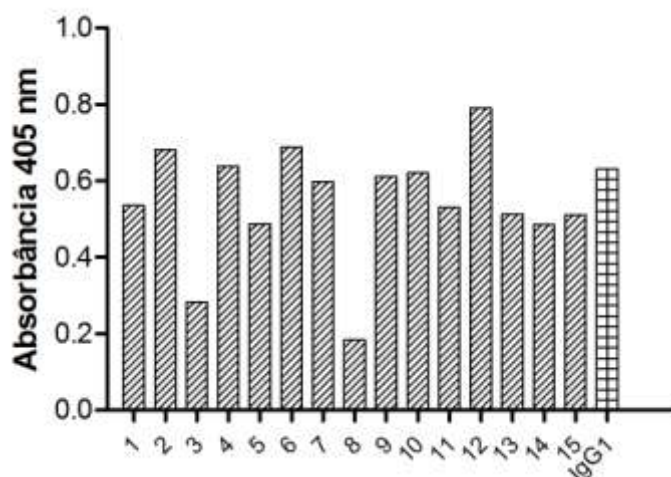
Na produção de hibridomas secretores de anticorpos contra melanina não obtivemos êxito nos quatro protocolos, as células após a seleção com meio HAT não sobreviveram, ou seja, nenhuma célula híbrida foi gerada nesses protocolos testados. No entanto, apenas o protocolo 5 mostrou ser eficiente, embora durante a diluição limitante os clones tenham morrido. Todos os soros policlonais das imunizações com melanina foram armazenados a -20 °C e, purificados por cromatografia de afinidade – Proteína A, de acordo com instruções do fabricante (Pierce).

#### **4.12 Obtenção de anticorpos monoclonais contra antígeno da parede celular de natureza glicoproteica derivado de *P. brasiliensis***

Os anticorpos monoclonais, contra a glicoproteína extraída do Pb18, foi produzido no “Hybridoma Facility of the Center at the Albert Einstein College of Medicine”. A reatividade dos clones foi avaliada através de ELISA e, a seleção dos clones por Soft Agar, todos os métodos previamente estabelecidos (154). Foi obtido um clone, de isotipo IgG1 e 15 clones de isotipo IgM, com densidade ótica menor que 1. Na figura 24 no eixo x, os números de 1 a 15 representam os clones de isotipo IgM.



**Figura 24** – Perfil das concentrações séricas de IgM (eixo x – 1 ao 15) e IgG dos clones obtidos contra glicoproteína derivada de *P. brasiliensis* (isolado 18), na diluição 1:100.



Fonte: Thomaz, 2012.

#### **4.13 Ensaios *in vitro* da atividade de anticorpos mono-específicos gerados contra monohexosilceramida extraída de *P. brasiliensis***

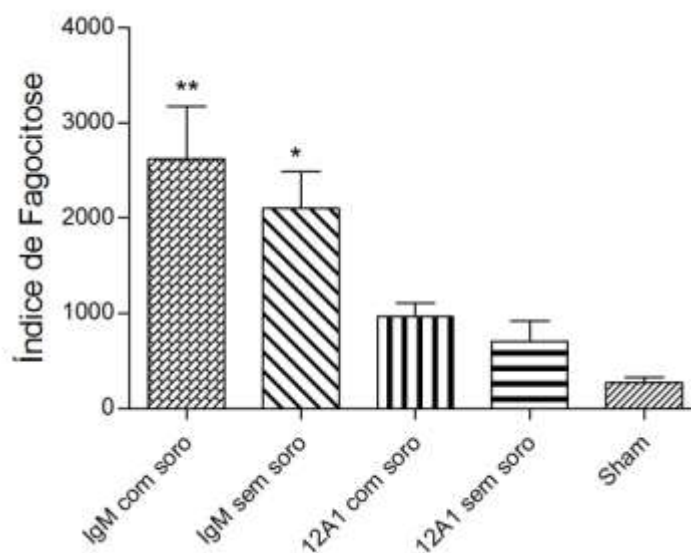
##### **4.13.1 Ensaio de fagocitose**

Para esses experimentos foi utilizado anticorpo mono-específico, de isotipo IgM, secretado pelo hibridoma gerado contra a molécula de CMH extraído da levedura Pb18. Embora os clones, secretores desse anticorpo, tenham morrido no processo de diluição limitante, o qual é necessário para continuação da técnica de obtenção de anticorpos monoclonais, foi armazenado amostras do sobrenadante de cultura dos clones, cujos anticorpos foram purificados pela técnica de PVDF, relatado anteriormente. Os ensaios foram feitos em duplicata.

A figura 23 exhibe a eficácia da IgM mono-específica contra CMH em auxiliar os macrófagos a fagocitar as leveduras de Pb18, no entanto, a imunoglobulina requer alguns componentes termolábeis do soro para ser hábil nesse processo, pois a IgM sem soro não foi significativa em relação ao anticorpo irrelevante, 12A1. Embora, a opsonização de micro-organismos seja realizada principalmente pelas imunoglobulinas de isotipo IgGs, através da ligação aos receptores Fc nos fagócitos, uma das funções da IgM é ativar a via clássica do complemento. Essa via do

complemento é iniciada pela ligação da proteína do complemento C1 aos domínios  $C_H-2$  da IgG ou aos domínios  $C_H-3$  das moléculas de IgM que se ligam ao antígeno. Cada região Fc da IgG possui um único sítio de ligação a C1q, e essa molécula só é ativada quando liga-se a duas cadeias pesadas de IgG. Porém, IgG é monomérica e, só possui apenas uma região Fc, múltiplas moléculas dessa imunoglobulina devem participar desse processo. Embora a IgM livre (circulante) seja pentamérica, ela não se liga a C1q, pois as regiões Fc da IgM são inacessíveis. A ligação da IgM a um antígeno induz uma alteração conformacional que expõe os sítios de ligação à C1q nas regiões Fc, dessa forma, como a IgM é pentamérica, uma única molécula de IgM pode-se ligar a duas moléculas de C1q, essa é uma das razões pelas quais a IgM é um anticorpo mais eficiente na ligação ao complemento do que a IgG. Podemos verificar ainda na figura 25, que a IgM reconheceu sua molécula alvo, CMH, presente nas leveduras de Pb18, opsonizando-as, através do produto do complemento, o qual foi ativado pela IgM; chamado C3b, promovendo assim sua fagocitose.

**Figura 25** - Índice de Fagocitose, o ensaio foi realizado utilizando-se a linhagem de macrófagos peritoneal-murino (J774.16), previamente ativados com IFN- $\gamma$  (50 U/ml), frente a leveduras de Pb18 e 100  $\mu\text{g/ml}$  do anticorpo monoespecífico contra CMH, por 12 horas, e o anticorpo controle, 12A1.



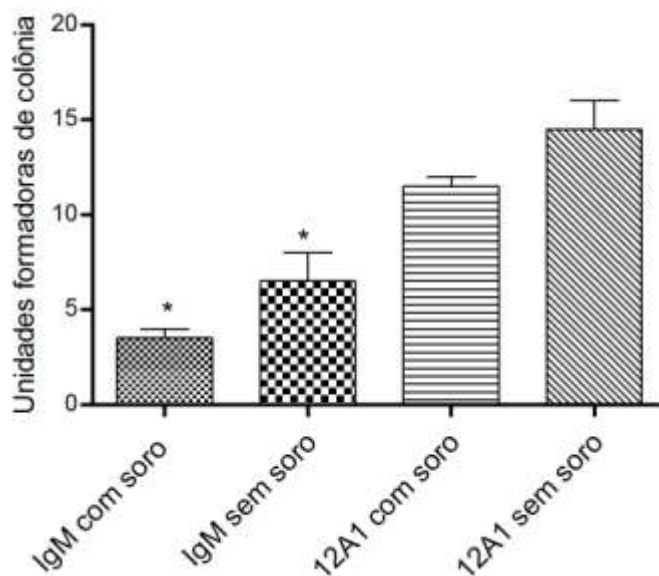
As barras indicam a média de duas leituras. Os valores são significativos em relação ao controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,005$ .

Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.13.2 Ensaio de viabilidade celular

Em paralelo à fagocitose foi realizado ensaio de viabilidade celular, para verificar a capacidade do anticorpo monoespecífico contra CMH ativar os macrófagos e, matar a levedura de *P. brasiliensis*. A IgM, tanto na presença ou não de soro pré imune, quando comparados ao controle 12A1 com ou sem soro, apresentaram significância, conforme exibido na figura 26. Embora, no ensaio de fagocitose a IgM sem soro não foi estatisticamente significativa, no ensaio de viabilidade celular ela se mostrou eficiente em matar as leveduras que foram internalizadas nas vesículas fagocíticas, os fagossomos, cuja fusão aos lisossomos destroem o antígeno fagocitado.

**Figura 26** – Ensaio de viabilidade celular, o ensaio foi realizado em paralelo a fagocitose, utilizando-se a linhagem de macrófagos peritoneal-murino (J774.16), frente a leveduras de Pb18 e 100 µg/ml do anticorpo monoespecífico contra CMH, por 12 horas, e o anticorpo controle, 12A1. Após o período de incubação cada poço foi plaqueado em meio preconizado.



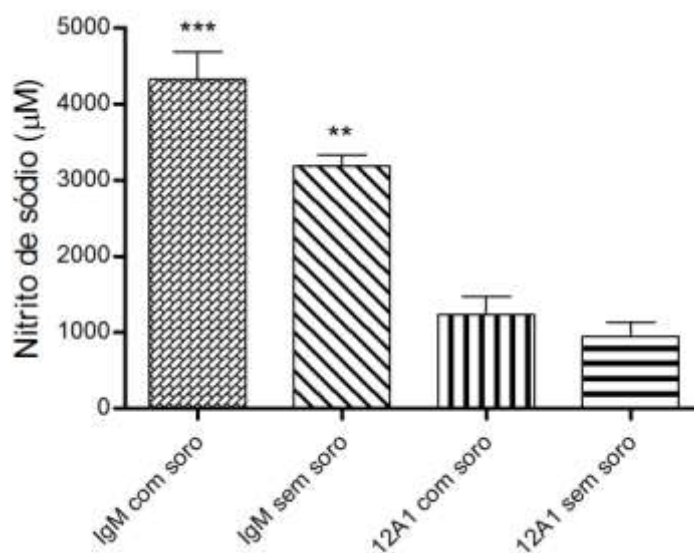
As barras indicam a média de duas leituras. Os valores são significativos em relação aos controles, \* $p < 0,05$ .

Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.13.3 Determinação da liberação de óxido nítrico (NO)

A geração de nitrito foi investigada no sobrenadante de cultura do ensaio de fagocitose acima descrito. Brevemente, após 12 horas de incubação, os macrófagos J774.16, na presença do anticorpo contra a molécula de CMH e, AcMAcM irrelevante (12A1), estimulados com IFN- $\gamma$  foram submetidos ao método de Griess para mensuração desse mediador citotóxico. Intermediários reativos de oxigênio apresentam citotoxicidade para os micro-organismos fagocitados. Foram detectadas concentrações significativas em comparação aos observados nos controles, exibido na figura 27.

**Figura 27** - Determinação da produção de nitrito. Macrófagos J774.16 foram incubados na presença de leveduras Pb18, na presença de anticorpo monoespecífico contra CMH e anticorpo monoclonal irrelevante (12A1), por 12 horas. Após esse período foi realizada a dosagem de nitritos no sobrenadante de cultura, através de microensaio por reagente de Griess.



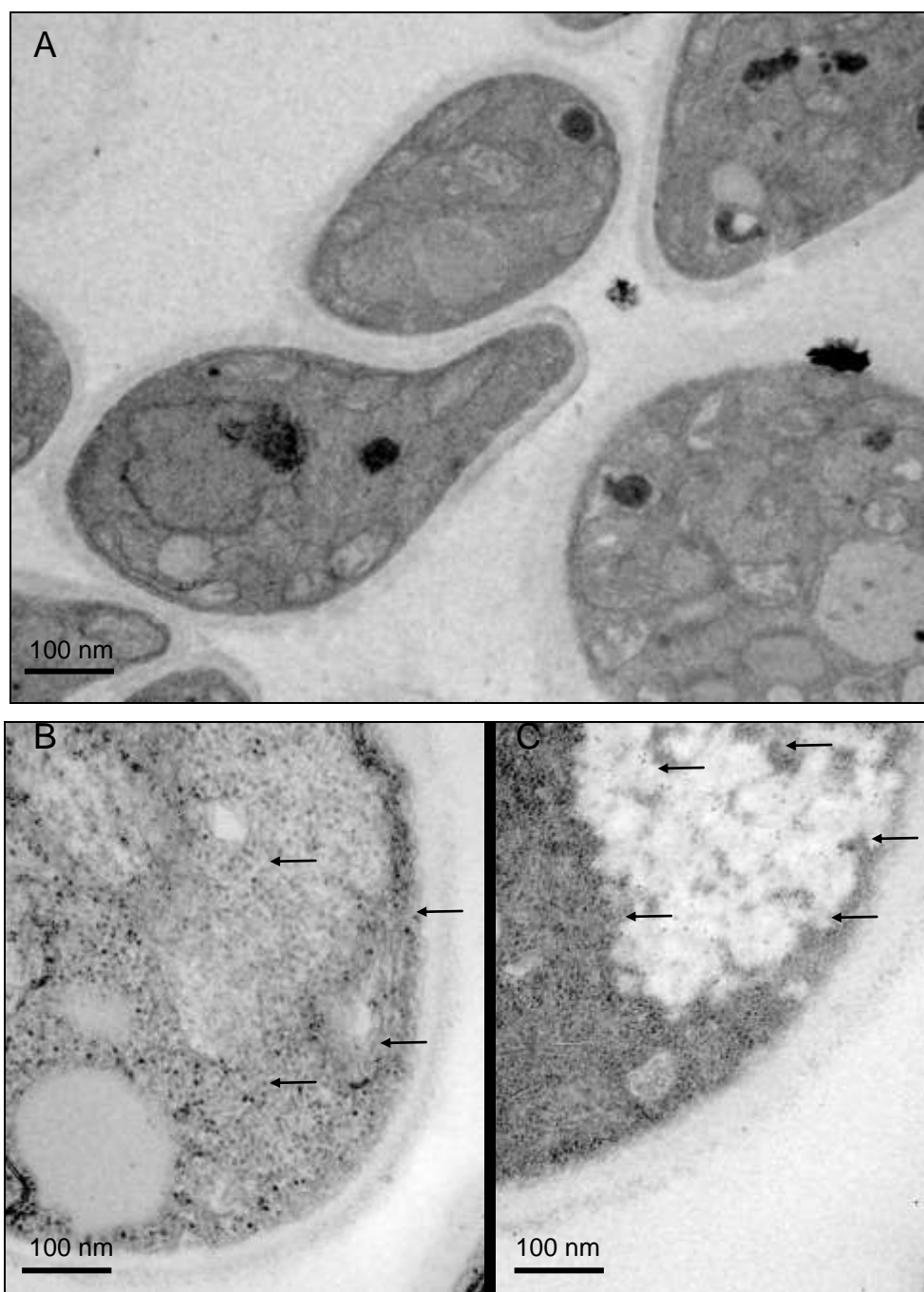
As barras indicam a média de três leituras. Os valores são significativos em relação aos controles, \*\* $p < 0,005$  e \*\*\* $p < 0,0005$ .

Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.13.4 Microscopia eletrônica de transmissão

A técnica de imunomarcção, realizada com partículas de ouro de 10 nm, nos permite verificar se há reconhecimento da estrutura fúngica com o anticorpo direcionado a molécula alvo, nesse caso o CMH. Foi uma técnica utilizada qualitativamente, no intuito de confirmar a capacidade de ligação do anticorpo monoespecífico à levedura, à qual dele a molécula foi extraída e produzida (figura 28).

**Figura 28** - Microscopia eletrônica de transmissão. Detecção da molécula de CMH nas estruturas internas de *P. brasiliensis*, isolado 18, através do anticorpo monoespecífico contra CMH.



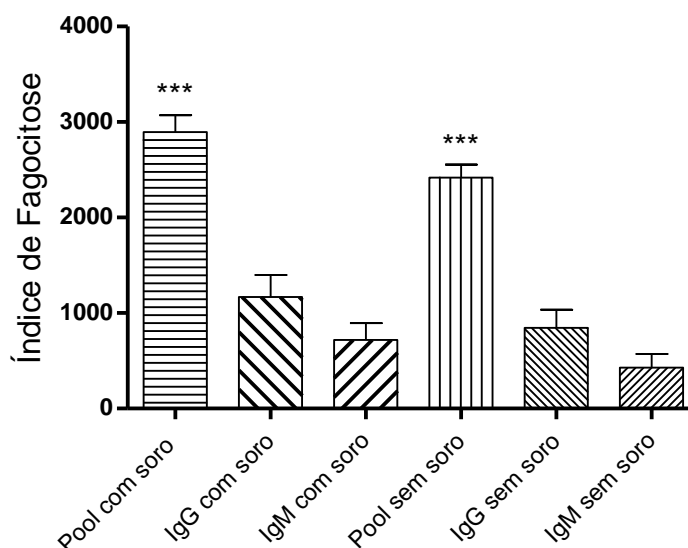
A transmissão eletrônica mostra em (A) a levedura incubada com anticorpo irrelevante de controle (A4) e, (B e C) incubado com anticorpo contra CMH na diluição de 1:10. Observe alguns pontos de imunomarcção (setas). Barras de escala de 4  $\mu\text{m}$ .

Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.14 Ensaios *in vitro* da atividade de anticorpos policlonais gerados contra melanina extraída de *P. brasiliensis*

Os soros policlonais retirados dos camundongos imunizados foram testados como pool. Os experimentos de fagocitose com os macrófagos da linhagem celular J774.16 foram feitos em triplicata. Como controles foram utilizados soros pré-ímmunes de camundongos e anticorpos irrelevantes IgG e IgM, todos na concentração de 100 µg/ml. Os anticorpos policlonais contra melanina foram capazes de alterar, *in vitro*, a fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis*, conforme indicado na Figura 29, a adição dos anticorpos aumentou significativamente o índice de fagocitose em relação aos controles (IgG, IgM na presença ou ausência de soro pré-ímmune). E não houve diferença estatística quando comparado o pool de anticorpos policlonais na presença de soro e na ausência.

**Figura 29** - Índice de Fagocitose, o ensaio foi realizado utilizando-se a linhagem de macrófagos peritoneal-murino (J774.16), previamente ativados com IFN-γ (50 U/ml), frente a leveduras de Pb18 e com 100 µg/ml dos anticorpos policlonais, por 12 horas, e os anticorpos irrelevantes, IgG e IgM, como controles.



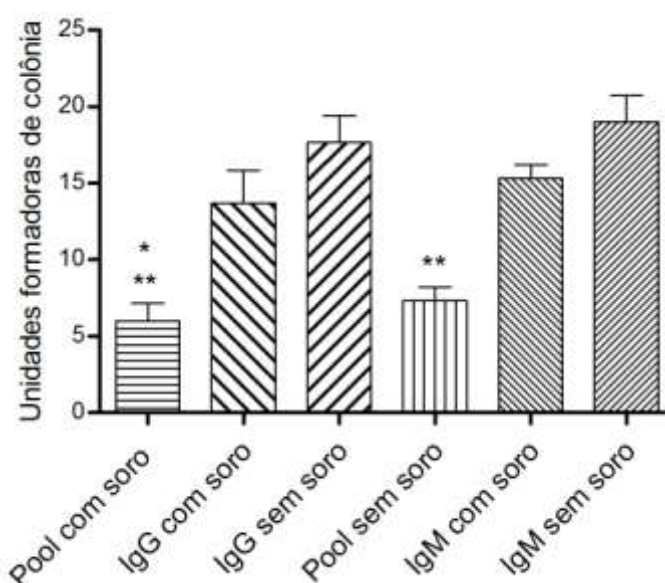
As barras indicam a média de três leituras. Os valores são significativos em relação aos controles, \*\*\* $p < 0,0005$ .

Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.15 Ensaio de viabilidade celular

Em paralelo à fagocitose foi realizado ensaio de viabilidade celular, cujo objetivo é avaliar se os macrófagos juntamente aos anticorpos adicionados possuem a capacidade de matar a levedura de *P. brasiliensis*. O eixo y do gráfico corresponde a unidades formadoras de colônia que cresceram após 10 dias de incubação em meio específico para a levedura termodimórfica. Os anticorpos contra melanina na presença do soro pré-imune, quando comparados ao controle IgG com soro, apresentaram menor significância (\*) do que quando comparados com controle IgM com soro (\*\*), conforme exibido na figura 30. É possível observar que o pool de anticorpos contra melanina foi eficiente em ativar os macrófagos matando assim as células fúngicas internalizadas, quando comparados a seus devidos controles. E não houve diferença estatística quando usado o pool de anticorpos policlonais na presença de soro com a ausência de soro.

**Figura 30** – Ensaio de viabilidade celular, o ensaio foi realizado em paralelo a fagocitose, utilizando-se a linhagem de macrófagos peritoneal-murino (J774.16), frente a leveduras de Pb18 e com 100 µg/ml dos anticorpos policlonais, por 12 horas, e os anticorpos irrelevantes, IgG e IgM, como controles. Após o período de incubação cada poço foi plaqueado em meio preconizado.



As barras indicam a média de três leituras. Os valores são significativos em relação aos controles, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,005$ .



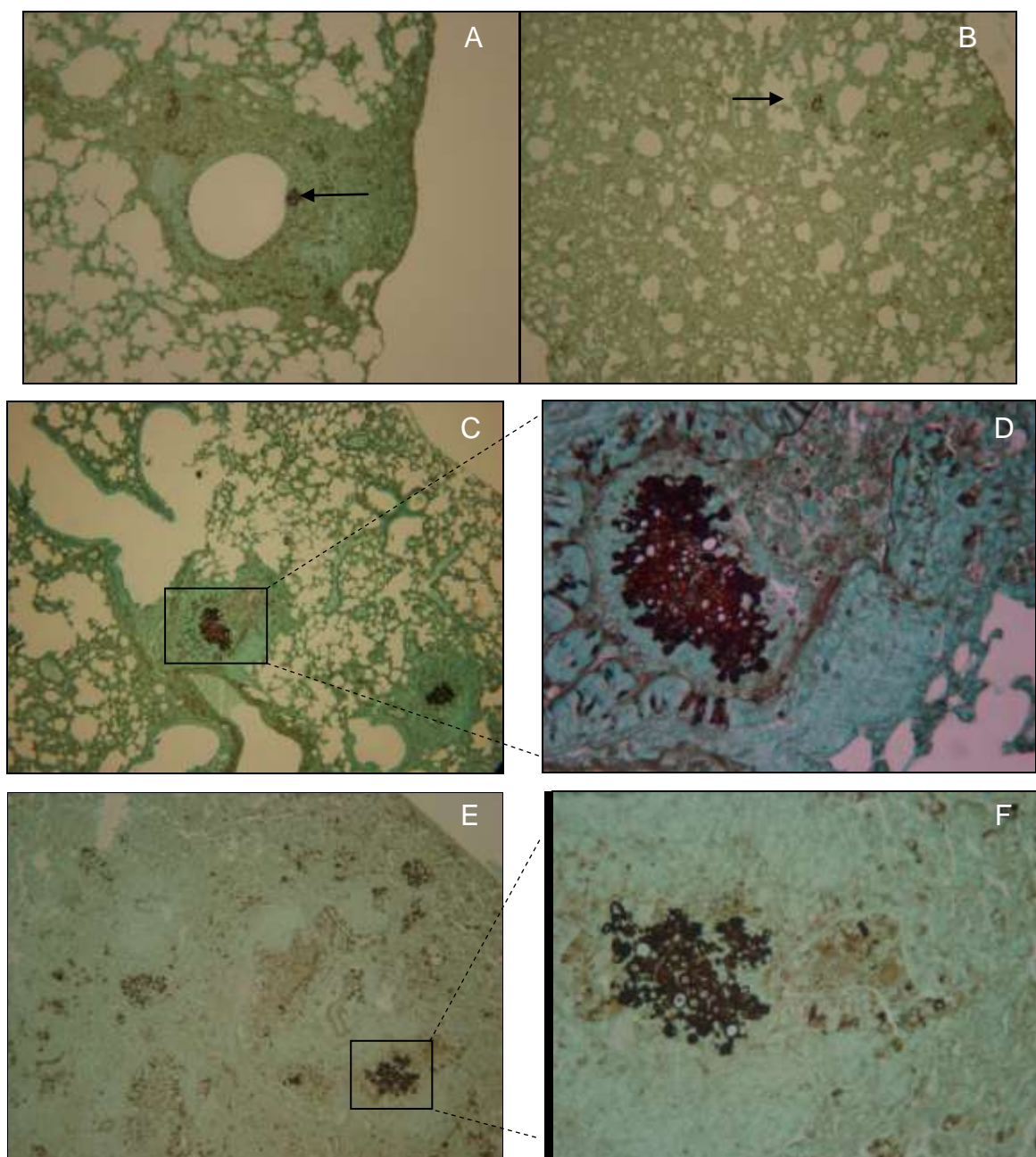
#### **4.16 Ensaio *in vivo* da atividade de anticorpos monoclonais contra CMH derivado de *Colletotrichum gloeosporioides* na infecção experimental por *P. brasiliensis***

Foi analisada a transferência passiva do anticorpo  $\alpha$ -CMH, 24 horas antes da infecção intratraqueal com leveduras de Pb18 e, três protocolos foram realizados, (I) após 15 dias (II) 30 dias e (III) 60 dias de infecção os animais foram sacrificados e analisados o papel *in vivo* do anticorpo contra CMH, através das técnicas de histopatologia, UFC e dosagem de citocinas.

##### 4.16.1 Histopatologia

Os pulmões dos animais dos grupos de estudo foram submetidos à análise histopatológica, com o objetivo de averiguar se o tratamento com o anticorpo monoclonal  $\alpha$ -CMH reduz a carga fúngica, conseqüentemente os danos teciduais. O protocolo I é exibido na figura 31, Em A e B podemos observar o início da formação de granulomas contendo algumas leveduras em seu interior, A e E são tratados com anticorpo irrelevante, A4, e B e C são tratados com anticorpo monoclonal  $\alpha$ -CMH. Não há uma grande disseminação do fungo com apenas 15 dias de infecção, no entanto é possível observar na figura 31C a presença de granuloma de aparência ligeiramente densa, maior aumento dessa estrutura em destaque é exibido na figura 31D ao lado, já a figura 31E mostra leveduras mais dispersas e uma grande concentração do micro-organismo sem estar contido por células que compõem o granuloma, maior aumento é apresentado na figura 31F ao lado. Granulomas densos atingem o objetivo de conter leveduras em seu interior, evitando o extravasamento do agente infeccioso provocando maiores danos teciduais no pulmão e, granulomas frouxos falham na contenção das leveduras.

**Figura 31** - Histopatologia dos pulmões dos camundongos BALB/c infectados com Pb18 e tratados com anticorpo monoclonal  $\alpha$ -CMH, e anticorpo irrelevante, A4, após 15 dias da infecção intratraqueal.

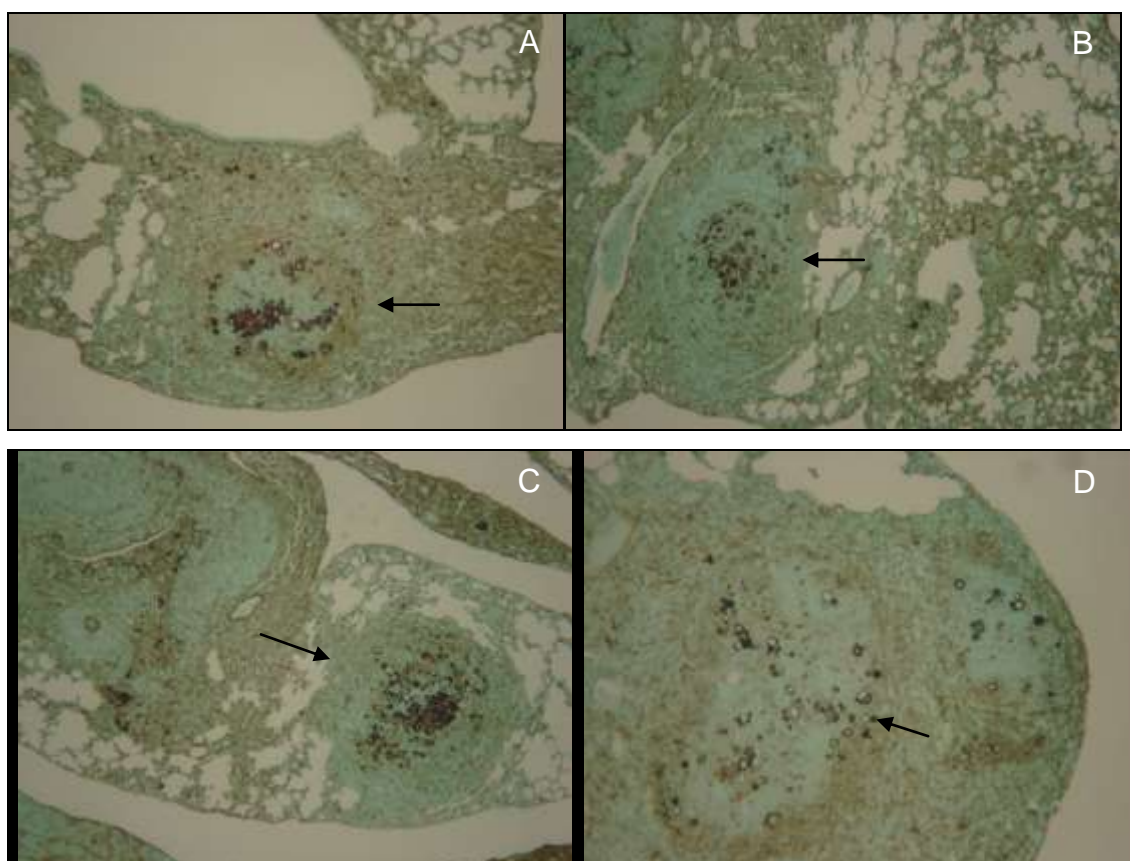


(A e D) tratados com AcM A4, (B e C) tratados com AcMAcM  $\alpha$ -CMH, nas figuras C e D no campo em destaque é possível observar maior aumento, 40x Coloração pelo método de Grocott, aumento de 25X. As setas indicam granulomas e/ou leveduras.

Fonte: Thomaz, 2012.

No protocolo II, apresentado na figura 32, é possível verificar em A e B, granulomas mais densos, e não foi observado muitas leveduras de Pb18 dispersas no tecido pulmonar de camundongos tratados com  $\alpha$ -CMH, ao contrário é visto na figura 32, (C e D), animais tratados com anticorpo irrelevante, com a presença de granulomas mais frouxos e leveduras dispersas pelo tecido analisado, além do tecido estar mais inflamado. Embora, como exibido na figura C, há também a formação de granulomas aparentemente densos contendo muitas leveduras internamente, porém, a maioria da amostragem se apresentou com leveduras dispersas, conforme é visto na figura 32D.

**Figura 32** - Histopatologia dos pulmões dos camundongos BALB/c infectados com Pb18 e tratados com anticorpo monoclonal  $\alpha$ -CMH, e anticorpo irrelevante, A4, após 30 dias da infecção intratecal.

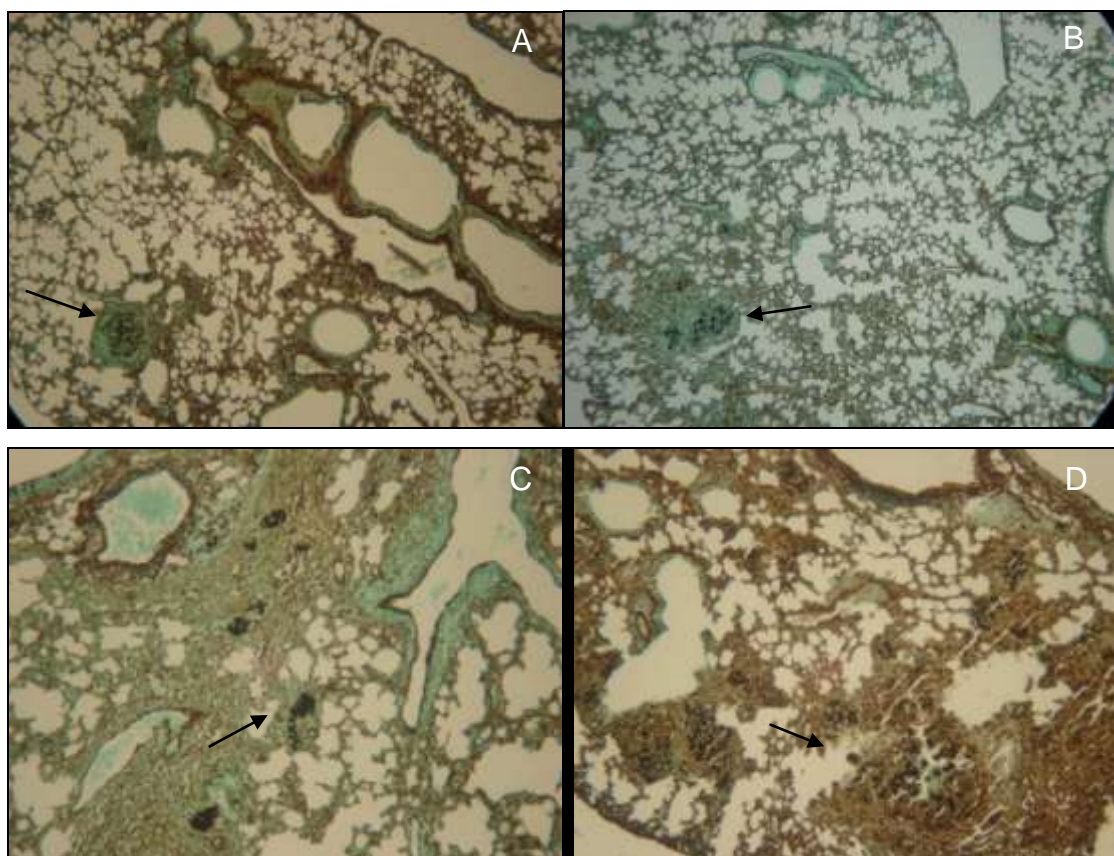


(A e B) tratados com AcM  $\alpha$ -CMH, (C e D) tratados com AcM A4. Coloração pelo método de Grocott, aumento de 25X. As setas indicam granulomas e/ou leveduras.

Fonte: Thomaz, 2012.

Podemos verificar na figura 33, protocolo III, que não ocorre uma grande disseminação fúngica nos pulmões de animais infectados com *P. brasiliensis* após 60 dias de infecção, o hospedeiro mesmo sem tratamento consegue aparentemente conter o processo infeccioso, mas é possível verificar nessa figura em A e B, poucos granulomas, porém, densos, e não foi observado muitas leveduras dispersas no tecido pulmonar, contrariamente é visto em C e D, animais tratados com anticorpo irrelevante, A4, onde observamos maior quantidade de granulomas mais frouxos e leveduras dispersas pelo tecido analisado, e o tecido apresenta-se mais inflamado.

**Figura 33** - Histopatologia dos pulmões dos camundongos BALB/c infectados com Pb18 e tratados com anticorpo monoclonal  $\alpha$ -CMH, e anticorpo irrelevante, A4, após 60 dias da infecção intratequeal.



(A e B) tratados com AcM  $\alpha$ -CMH, (C e D) tratados com AcM A4. Coloração pelo método de Grocott, aumento de 25X. As setas indicam granulomas e/ou leveduras.

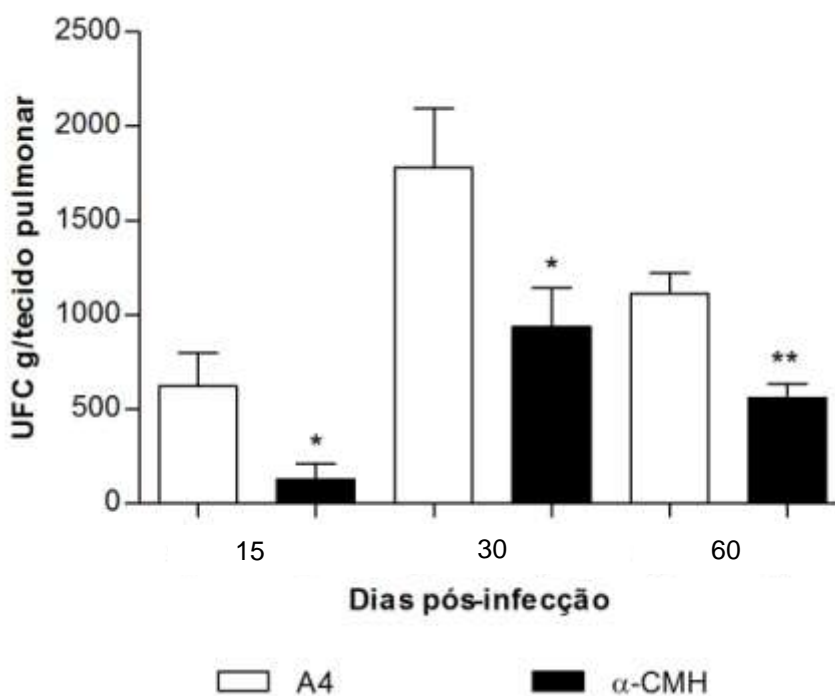
Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.16.2 Determinação da carga fúngica nos pulmões

Outro parâmetro analisado para avaliar a atividade *in vivo* do anticorpo monoclonal  $\alpha$ -CMH no modelo de paracoccidiodomicose experimental, foi a determinação da carga fúngica nos pulmões dos grupos de animais infectados intratraquealmente com leveduras de *P. brasiliensis*, isolado 18 e tratados com anticorpo monoclonal irrelevante, A4 e, anticorpo monoclonal de interesse,  $\alpha$ -CMH.

Os camundongos BALB/c receberam, 24 horas antes da infecção intratraqueal, 1 mg de anticorpo monoclonal,  $\alpha$ -CMH ou A4, pela via intraperitoneal e, após 15, 30 e 60 dias de infecção, os animais foram sacrificados e os órgãos pelo qual a levedura tem tropismo foram analisados, fígado, baço e pulmão, determinando desta forma a carga fúngica. Os resultados foram expressos em unidade formadora de colônia, UFC, por grama de tecido, conforme figura 34. Não houve disseminação fúngica nos órgãos: baço e fígado (dados não mostrados). O tratamento com o AcM  $\alpha$ -CMH reduziu a carga fúngica nos pulmões, conseqüentemente a infecção, quando comparado ao grupo de tratamento irrelevante, nos três protocolos estudados. Após 60 dias o tratamento com o anticorpo monoclonal de interesse apresentou  $P = 0,0015$ , sendo a maior significância apresentada.

**Figura 34** – Unidades formadoras de colônia de pulmões de camundongos BALB/c que receberam 1 mg de AcM  $\alpha$ -CMH ou A4, 24 horas antes da infecção com Pb18 e sacrificados após 15, 30 e 60 dias da infecção.



Os valores são significativos em relação ao controle, tratado com AcM irrelevante, A4, \* $p < 0,05$  e \*\*  $p = 0,0015$ .

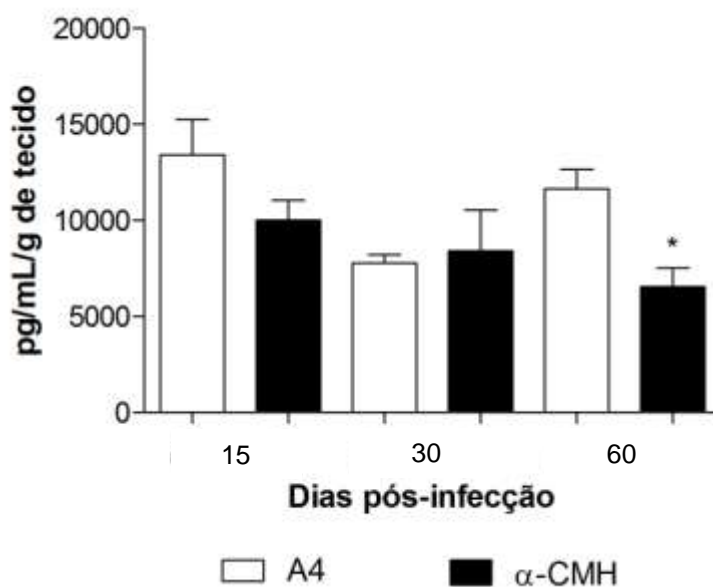
Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.16.3 Detecção e quantificação das citocinas IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$

A determinação da polarização de resposta imune produzida após o tratamento com anticorpo monoclonal,  $\alpha$ -CMH, e anticorpo monoclonal irrelevante, A4, seguido do desafio com leveduras de Pb18, foi através da detecção das citocinas IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , quantitativamente pelo método de ELISA, conforme instruções do fabricante (BD-PharMingen), utilizando amostra de pulmão extraída dos camundongos BALB/c e macerada em solução contendo inibidor de proteases.

Observamos que os níveis de IL-4 no grupo tratado com o AcM  $\alpha$ -CMH foram menores em relação ao grupo tratado com anticorpo irrelevante, no entanto a diferença estatística só foi vista no protocolo III, com 60 dias após a infecção (figura 35).

**Figura 35** - Quantificação de IL-4 pelo método de ELISA presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com AcM contra CMH e AcM irrelevante (A4), após 15, 30 e 60 dias após a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.

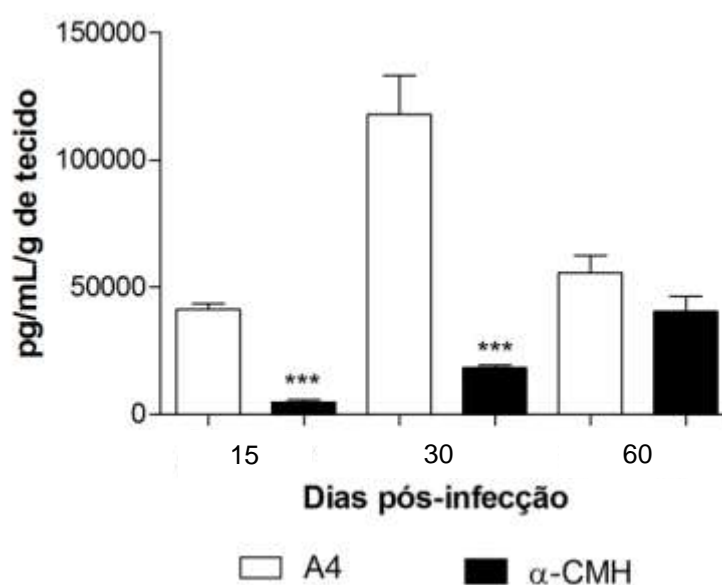


A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em duplicata, \* $p < 0,05$  relativo aos animais controle (tratados com anticorpo monoclonal irrelevante – A4).

Fonte: Thomaz, 2012.

A figura 36 indica os valores para IL-10, podemos observar que o anticorpo  $\alpha$ -CMH reduziu drasticamente os níveis dessa citocina, quando comparados ao controle, anticorpo irrelevante, nos protocolos de 15 e 30 dias após a infecção com a levedura termodimórfica, porém, com 60 dias não houve diferença estatística.

**Figura 36** - Quantificação de IL-10 pelo método de ELISA presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com AcM contra CMH e AcM irrelevante (A4), após 15, 30 e 60 dias após a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.



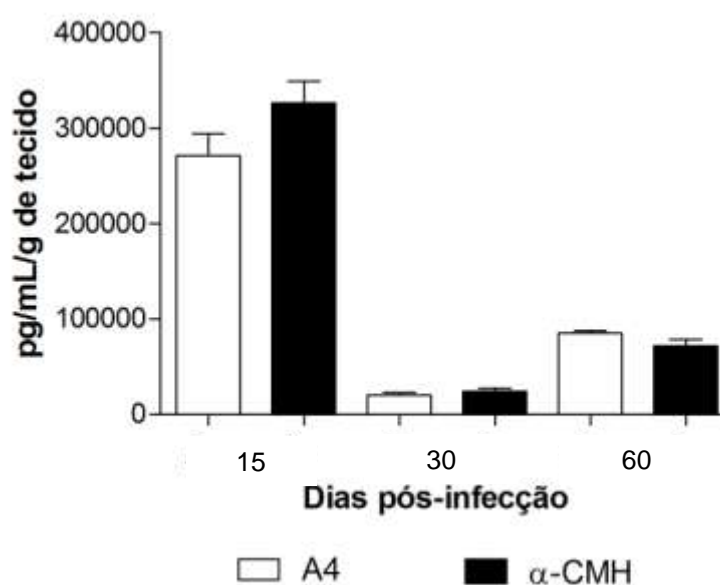
A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em duplicata, \*\*\* $p < 0,0001$  relativo aos animais controle (tratados com anticorpo monoclonal irrelevante – A4).

Fonte: Thomaz, 2012.



As figuras 37 e 38 representam as citocinas IL-12p40 e IL-12p70, respectivamente, não houve diferença estatística para IL-12p40 em todos os protocolos estudados, mas para a IL-12p70, nos 3 protocolos, o anticorpo  $\alpha$ -CMH aumentou a produção dessa citocina.

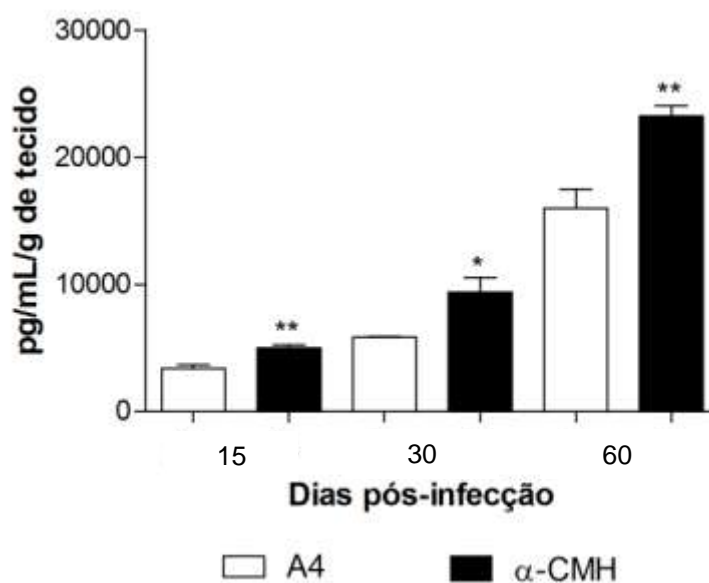
**Figura 37** - Quantificação de IL-12p40 pelo método de ELISA presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com AcM contra CMH e AcM irrelevante (A4), após 15, 30 e 60 dias após a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.



A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Fonte: Thomaz, 2012.

**Figura 38** - Quantificação de IL-12p70 pelo método de ELISA presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com AcM contra CMH e AcM irrelevante (A4), após 15, 30 e 60 dias após a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.

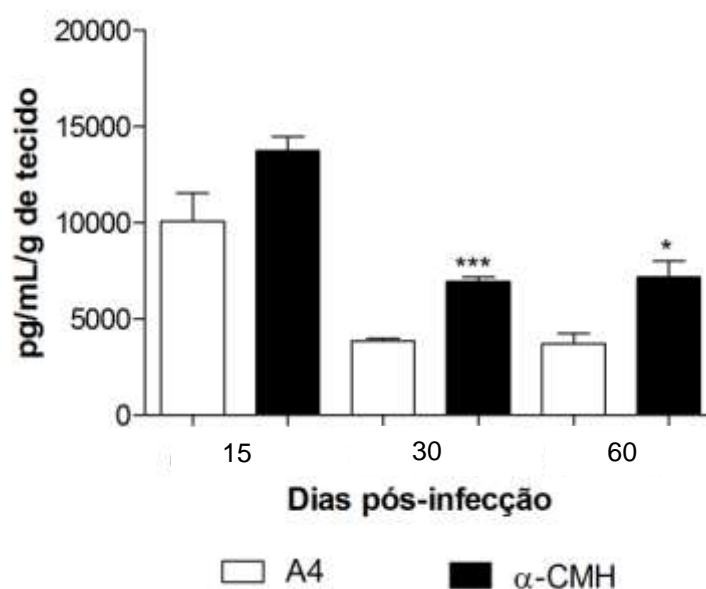


A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em duplicata, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,005$  relativo aos animais controle (tratados com anticorpo monoclonal irrelevante – A4).

Fonte: Thomaz, 2012.

A Figura 39 indica os valores do fator de necrose tumoral, TNF- $\alpha$ , citocina pró-inflamatória, podemos observar que o AcM  $\alpha$ -CMH aumentou significativamente os níveis dessa citocina, após 30 e 60 dias de infecção, em relação ao controle, tratado com AcM irrelevante, A4. O protocolo I, com 15 dias após a infecção, não apresentou diferença estatística.

**Figura 39** - Quantificação de TNF- $\alpha$  pelo método de ELISA presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com AcM contra CMH e AcM irrelevante (A4), após 15, 30 e 60 dias após a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.

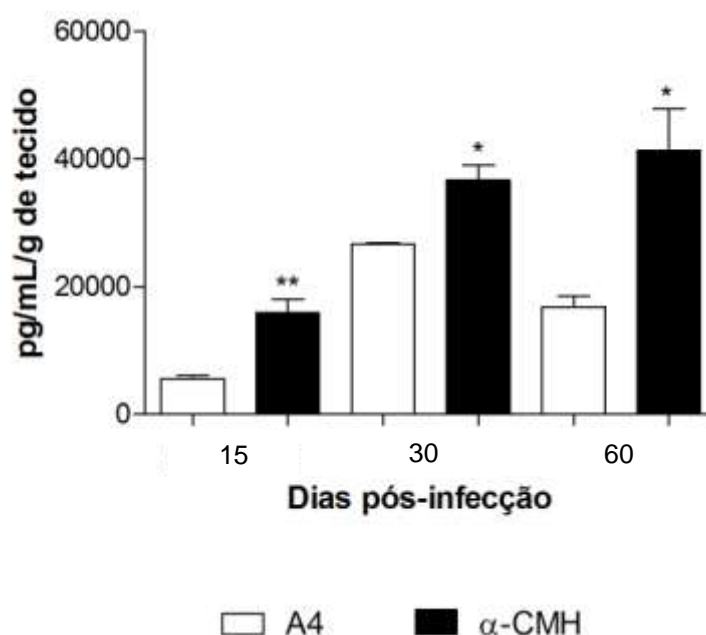


A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em duplicata, \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,0001$  relativo aos animais controle (tratados com anticorpo monoclonal irrelevante – A4).

Fonte: Thomaz, 2012.

A Figura 40 indica os valores de IFN- $\gamma$ , citocina pró-inflamatória, podemos observar que o AcM  $\alpha$ -CMH, em todos os protocolos estudados, após 15, 30 e 60 dias de infecção, aumentou os níveis dessa citocina, quando comparados ao controle, anticorpo irrelevante.

**Figura 40** - Quantificação de IFN- $\gamma$  pelo método de ELISA presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com AcM contra CMH e AcM irrelevante (A4), após 15, 30 e 60 dias após a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*. A concentração da citocina é expressa em pg/ml.



Os experimentos foram realizados em duplicata, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,005$  relativo aos animais controle (tratados com anticorpo monoclonal irrelevante – A4).

Fonte: Thomaz, 2012.

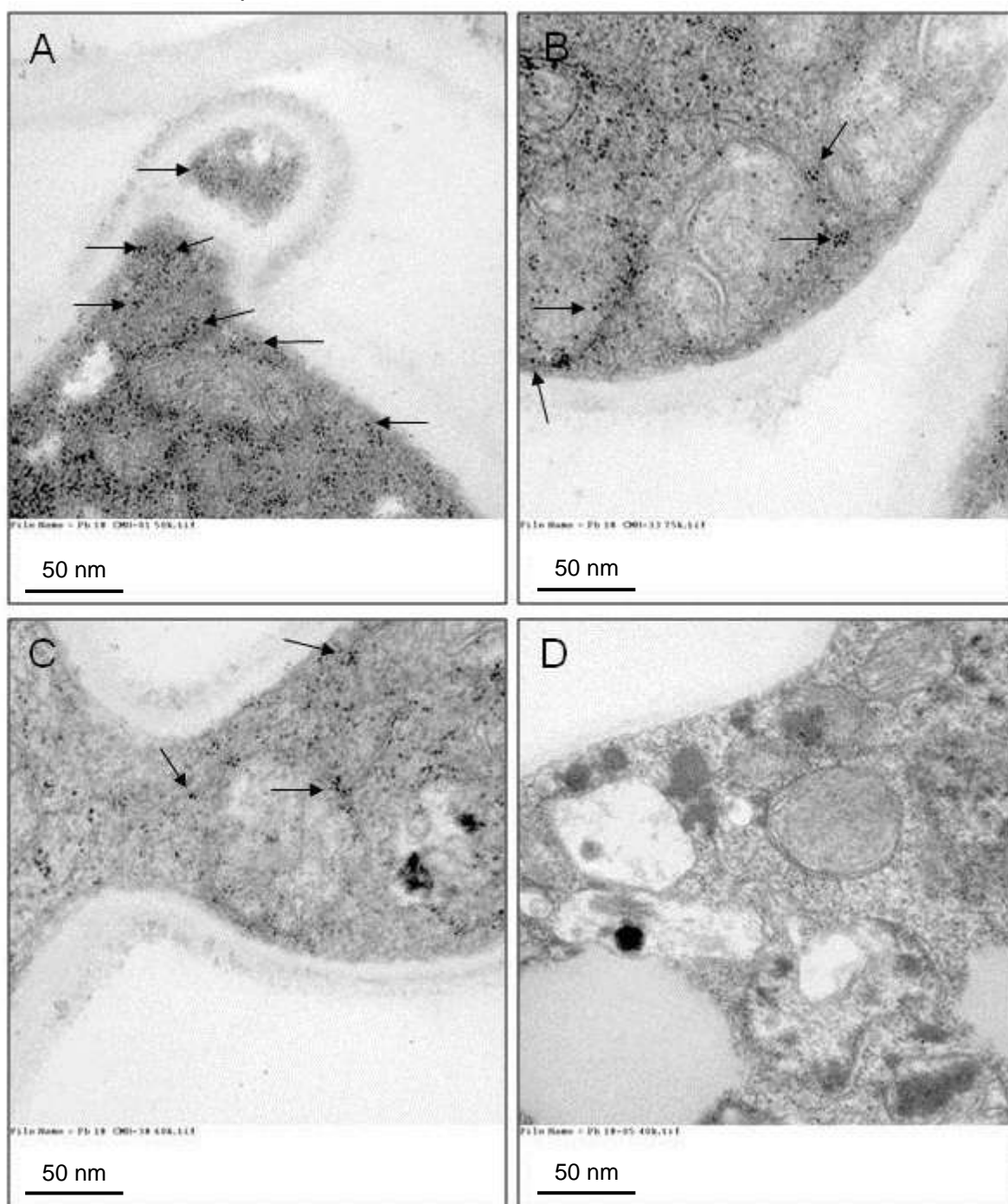
#### 4.17 Ensaios *in vitro* da atividade de anticorpos monoclonais contra CMH derivado de *Colletotrichum gloeosporioides* na infecção experimental por *P. brasiliensis*

##### 4.17.1 Microscopia eletrônica de transmissão

A mesma técnica cuja amostra, o anticorpo monoespecífico, de isotipo IgM, gerado durante esse estudo, foi realizada usando o anticorpo monoclonal  $\alpha$ -CMH, gerado contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*. Na figura 41

observamos marcações com ouro nas estruturas internas de Pb18, é interessante observar as marcações próximas aos brotamentos da célula fúngica.

**Figura 41** – Microscopia eletrônica de transmissão. Detecção da molécula de CMH nas estruturas internas de *P. brasiliensis*, isolado 18, através do anticorpo monoclonal  $\alpha$ -CMH contra CMH.



A transmissão eletrônica mostra em (A, B e C) a levedura incubada com  $\alpha$ -CMH e em (D) incubada com anticorpo irrelevante de controle (A4), os anticorpos foram incubados na diluição de 1:10. Observe alguns pontos de imunomarcação (setas). Barras de escala de 4 $\mu$ m.

Fonte: Thomaz, 2012.

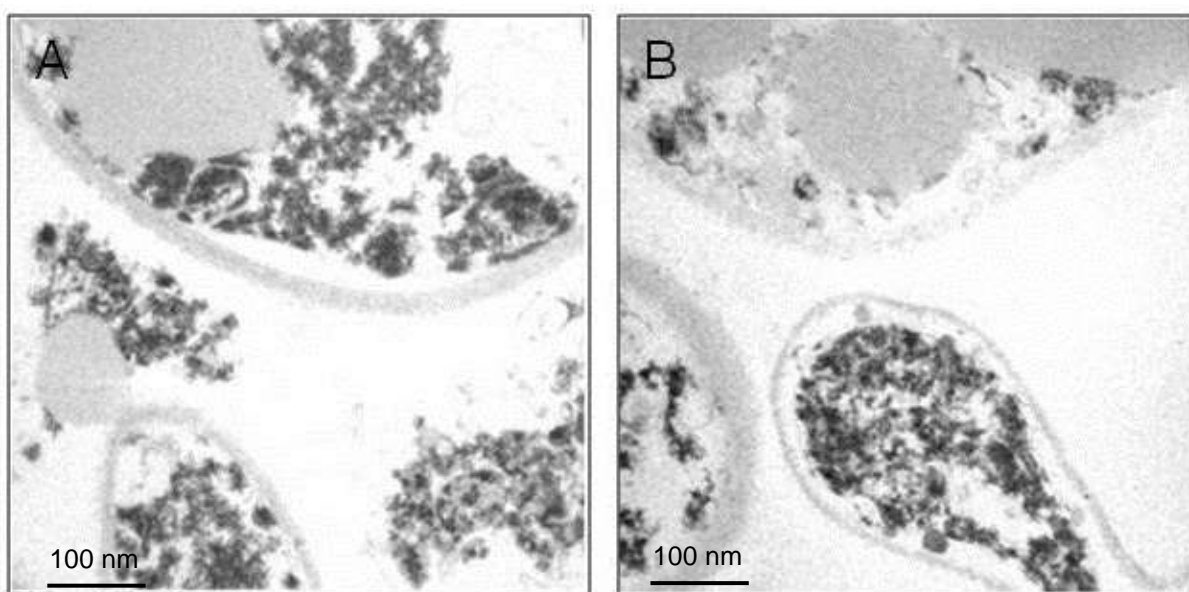
#### 4.18 Ensaio *in vitro* dos anticorpos monoclonais gerados contra glicoproteína derivada da extração alcalina de *Paracoccidioides brasiliensis*

##### 4.18.1 Microscopia eletrônica de transmissão

A mesma técnica descrita acima foi feita para verificar o reconhecimento de 4 clones obtidos contra a glicoproteína derivada de Pb18. Foram escolhidos 1 clone IgG e 2 clones IgM. Podemos observar na figura 42 que houve marcação apenas para o anticorpo IgG, internamente da levedura (E) e na parede celular de *P. brasiliensis* (F).

**Figura 42** – Microscopia eletrônica de transmissão. Detecção do antígeno glicoproteico nas estruturas internas de *P. brasiliensis*, isolado 18, através dos anticorpos monoclonais gerados contra a glicoproteína.

(continua)

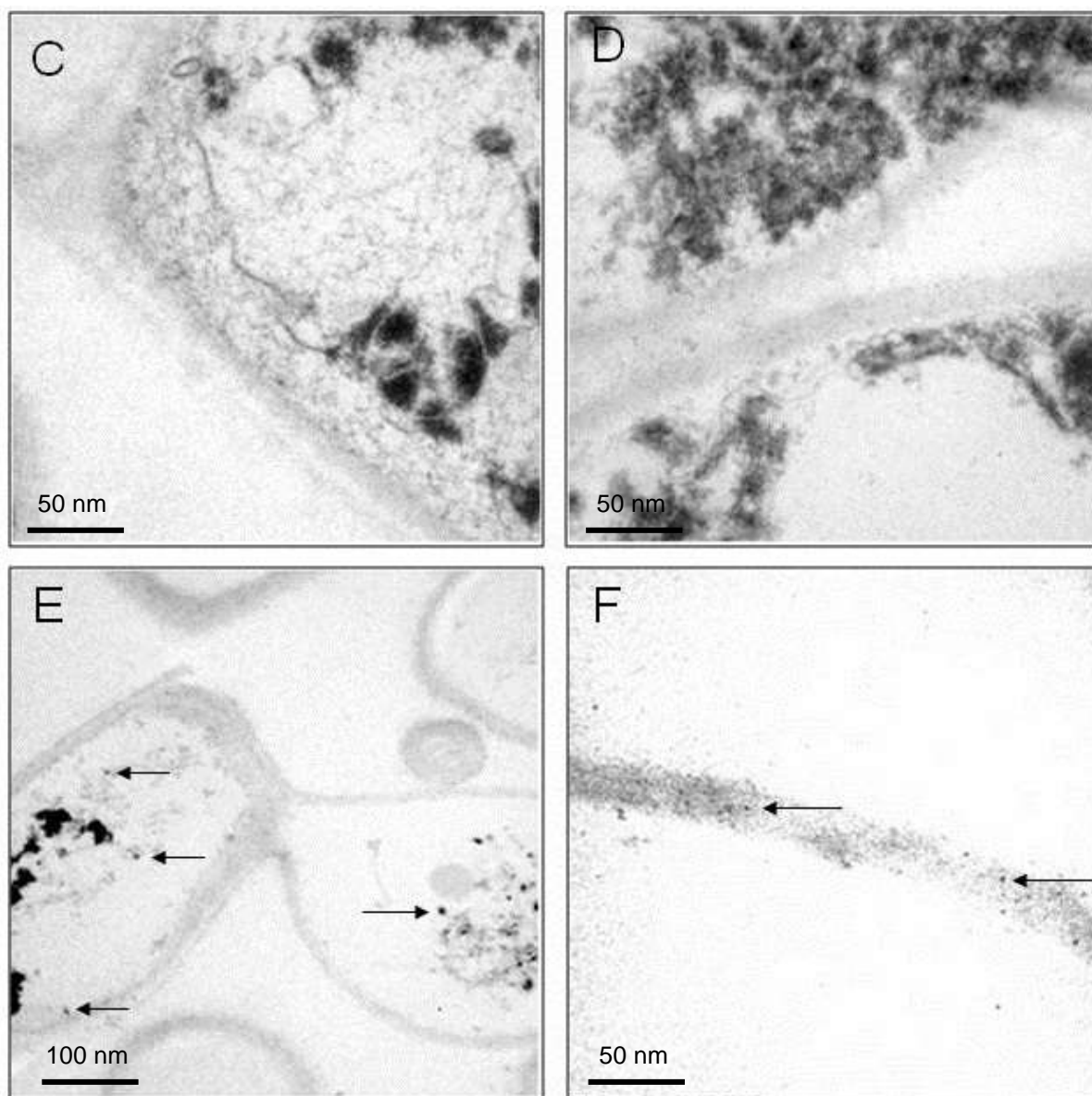


A transmissão eletrônica mostra em (A) anticorpo irrelevante de controle (A4), (B e C) a levedura incubada com dois clones secretores de IgM (C4 e E12) e em (D, E e F) incubada com o clone secretor de IgG (F1.4.19). Todos os anticorpos foram incubados na diluição de 1:10. Observe alguns pontos de imunomarcção (setas). Barras de escala de 4  $\mu$ m.

Fonte: Thomaz, 2012.

**Figura 42** – Microscopia eletrônica de transmissão. Detecção do antígeno glicoproteico nas estruturas internas de *P. brasiliensis*, isolado 18, através dos anticorpos monoclonais gerados contra a glicoproteína.

(conclusão)



A transmissão eletrônica mostra em (A) anticorpo irrelevante de controle (A4), (B e C) a levedura incubada com dois clones secretores de IgM (C4 e E12) e em (D, E e F) incubada com o clone secretor de IgG (F1.4.19). Todos os anticorpos foram incubados na diluição de 1:10. Observe alguns pontos de imunomarcacão (setas). Barras de escala de 4  $\mu$ m.

Fonte: Thomaz, 2012.



#### **4.19 Avaliação da atividade de anticorpos monoclonais gerados contra Hsp60 derivada de *Histoplasma capsulatum* na infecção experimental por *P. lutzii***

Esses experimentos foram realizados no laboratório de Doenças Infecciosas do professor Joshua Nosanchuk do Albert Einstein, nos Estados Unidos, o mesmo tem autorização para manipular o isolado *P. lutzii*, por isso o utilizamos ao invés do isolado Pb18. E utilizamos os anticorpos monoclonais que foram desenvolvidos contra Hsp60, antígeno derivado de *H. capsulatum* em modelo de PCM experimental devido à homologia da Hsp60 entre essas espécies.

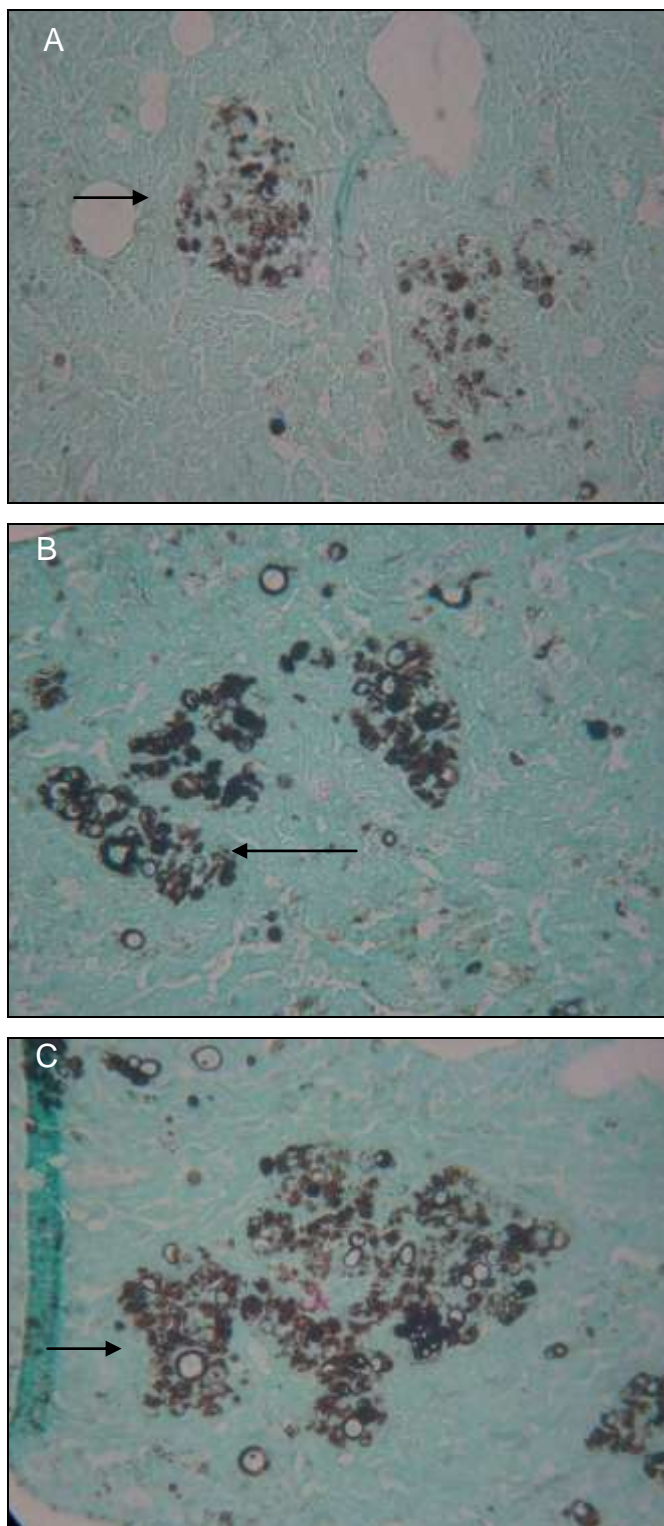
A atividade *in vivo* dos anticorpos monoclonais, 4E12 e 7B6 gerados contra Hsp60 de *Histoplasma capsulatum* foi avaliada frente ao desafio com leveduras de *P. lutzii*. Os clones foram cedidos gentilmente pelo pesquisador e professor Joshua D. Nosanchuk e por Allan J. Guimarães, do Albert Einstein College of Medicine, em Nova Iorque.

Os animais receberam 1 mg dos anticorpos 4E12, de isotipo IgG2a e 7B6, de isotipo IgG2b administrados 24 horas antes da infecção. Decorridos 15 dias os animais foram sacrificados e as análises de interesse foram feitas.

##### 4.19.1 Histopatologia

Amostras de pulmão dos camundongos infectados foram encaminhadas ao Laboratório de Histotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas, no Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo, para serem fixadas em formalina a 10% para posterior inclusão em parafina, preparação da lâmina e coloração pela prata. Podemos observar na figura 43 em (A) animais tratados com AcM 4E12, granulomas contendo as leveduras, de aparência compacta, em (B) animais tratados com AcM 7B6, granulomas levemente frouxo, e em maior quantidade e em (C) grupo controle, aqueles que receberam AcM irrelevante A4, não vemos a formação de granulomas e as leveduras estão dispersas no tecido pulmonar dos animais.

**Figura 43** - Histopatologia dos pulmões dos camundongos BALB/c infectados com Pb01 e tratados com anticorpo monoclonal contra Hsp60 e anticorpo irrelevante, A4, após 15 dias da infecção intratraqueal.



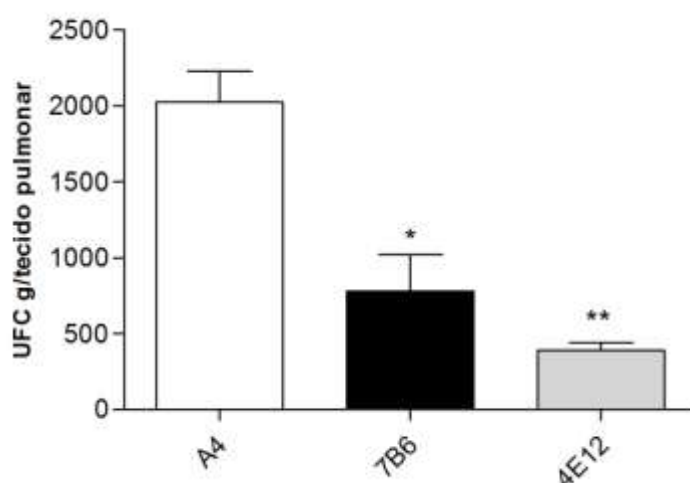
(A) AcM 4E12, (B) AcM 7B6, (C) AcM A4. Coloração pelo método de Grocott, aumento de 25X. As setas indicam granulomas e/ou leveduras.

Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.19.2 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC)

Após 15 dias de infecção foi realizado o sacrifício dos animais, a figura 44 apresenta a contagem das unidades formadoras de colônia, após o sacrifício dos animais tratados com os anticorpos de interesse, o AcM 4E12 mostrou ser mais eficiente na redução e contenção da carga fúngica dos pulmões quando comparado ao AcM 7B6.

**Figura 44** - Unidades formadoras de colônias dos pulmões de camundongos BALB/c que receberam 1 mg dos anticorpos monoclonais 7B6 e 4E12 e irrelevante, A4, 15 dias após da infecção com Pb18.



O valor é significativo em relação ao controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,005$ .

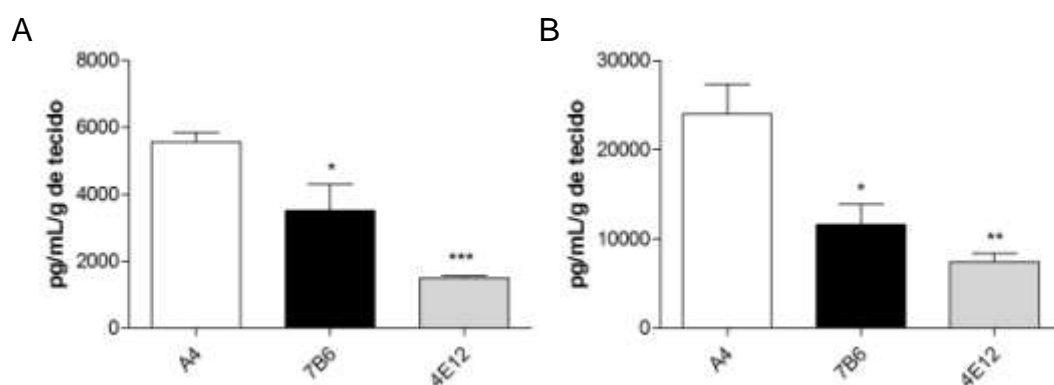
Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.19.3 Detecção e quantificação de citocinas IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, e IFN- $\gamma$

A detecção da polarização da resposta imune pelas citocinas foi realizada quantitativamente pelo método de ELISA, conforme instruções do fabricante (BD-PharMingen). A figura 45 mostram as citocinas encontradas em maior quantidade na resposta de perfil  $T_H2$ , em (A) IL-4, em (B) IL-10. Os dois anticorpos de interesse, 4E12 e 7B6 reduziram os níveis dessas citocinas, porém, o AcM 4E12 apresentou maior significância, tanto para IL-4 como IL-10.

Assim como realizado para as citocinas IL-4 e IL-10, foram dosadas as citocinas com perfil de resposta  $T_h1$ , IL-12p40, IL12p70 e IFN- $\gamma$ . Podemos observar na figura 46 em (A) que somente o tratamento com o AcM 7B6 foi estatisticamente significativo, na redução dessa citocina, em (B) os níveis de IL-12p70 foi aumentado para o AcM 4E12, e não houve diferença estatística quando comparado ao anticorpo irrelevante de controle, A4. A figura 47 mostra os valores para IFN- $\gamma$ , os dois anticorpos aumentaram a sua secreção quando comparados ao controle, e o AcM 4E12 apresentou maior significância.

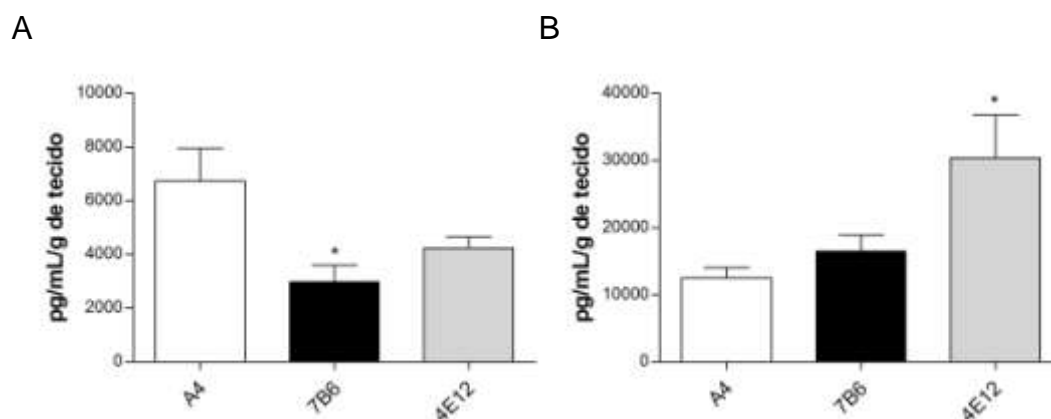
**Figura 45** - (A) Quantificação de IL-4 e (B) quantificação de IL-10 presentes no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com os anticorpos monoclonais contra Hsp60, 7B6 e 4E12 e AcM irrelevante (A4).



A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em duplicata. Os valores são significantes em relação ao controle (A4), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$  e \*\*\* $p < 0,0005$ .

Fonte: Thomaz, 2012.

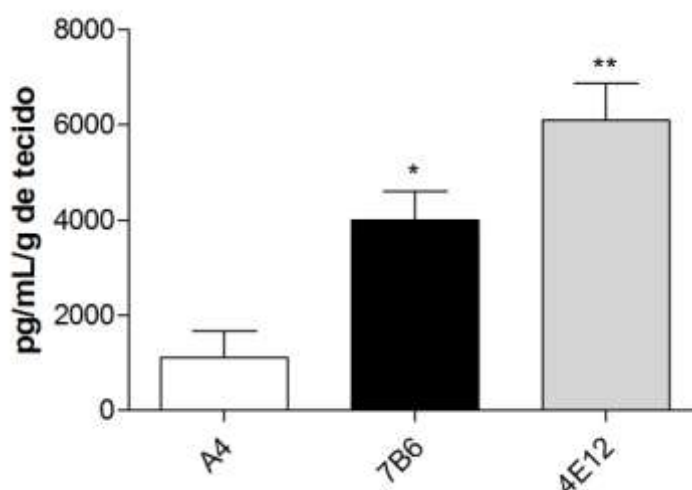
**Figura 46** - (A) Quantificação de IL-12p40 e (B) quantificação de IL-12p70 presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com os anticorpos monoclonais contra Hsp60, 7B6 e 4E12 e AcM irrelevante (A4).



A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em duplicata. Os valores são significantes em relação ao controle (A4), \* $p < 0,05$ .

Fonte: Thomaz, 2012.

**Figura 47** - Quantificação de IFN- $\gamma$  presente no homogenato de pulmão de camundongos BALB/c tratados, 24 horas antes da infecção intratraqueal, com os anticorpos monoclonais contra Hsp60, 7B6 e 4E12 e AcM irrelevante (A4).



A concentração da citocina é expressa em pg/ml. Os experimentos foram realizados em duplicata. Os valores são significantes em relação ao controle (A4), \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,005$ .

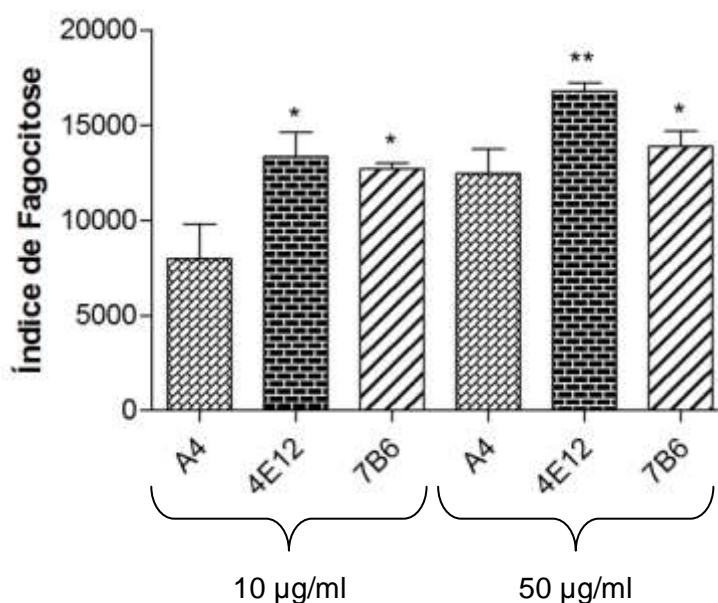
Fonte: Thomaz, 2012.

## 4.20 Avaliação da atividade *in vitro* de anticorpos monoclonais gerados contra Hsp60 derivada de *Histoplasma capsulatum* na infecção experimental por *P. lutzii*

### 4.20.1 Fagocitose

Foi realizado experimentos de fagocitose, de acordo ao protocolo anteriormente descrito, com duas concentrações dos anticorpos monoclonais, 7B6 e 4E12, 10 µg/ml e 50 µg/ml. Como mostrado na figura 48, na menor concentração utilizada, 10 µg/ml, os AcMs estimularam a fagocitose e o efeito foi maior com a maior concentração, 50 µg/ml, mas apenas com o AcM 4E12.

**Figura 48** - Índice de Fagocitose, o ensaio foi realizado utilizando-se a linhagem de macrófagos peritoneal-murino (J774.16), previamente ativados com IFN-γ (50 U/ml), frente a leveduras de *P. lutzii* e 10 e 50 µg/ml dos anticorpos monoclonais contra Hsp60, por 12 horas, e o anticorpo irrelevante como controle .



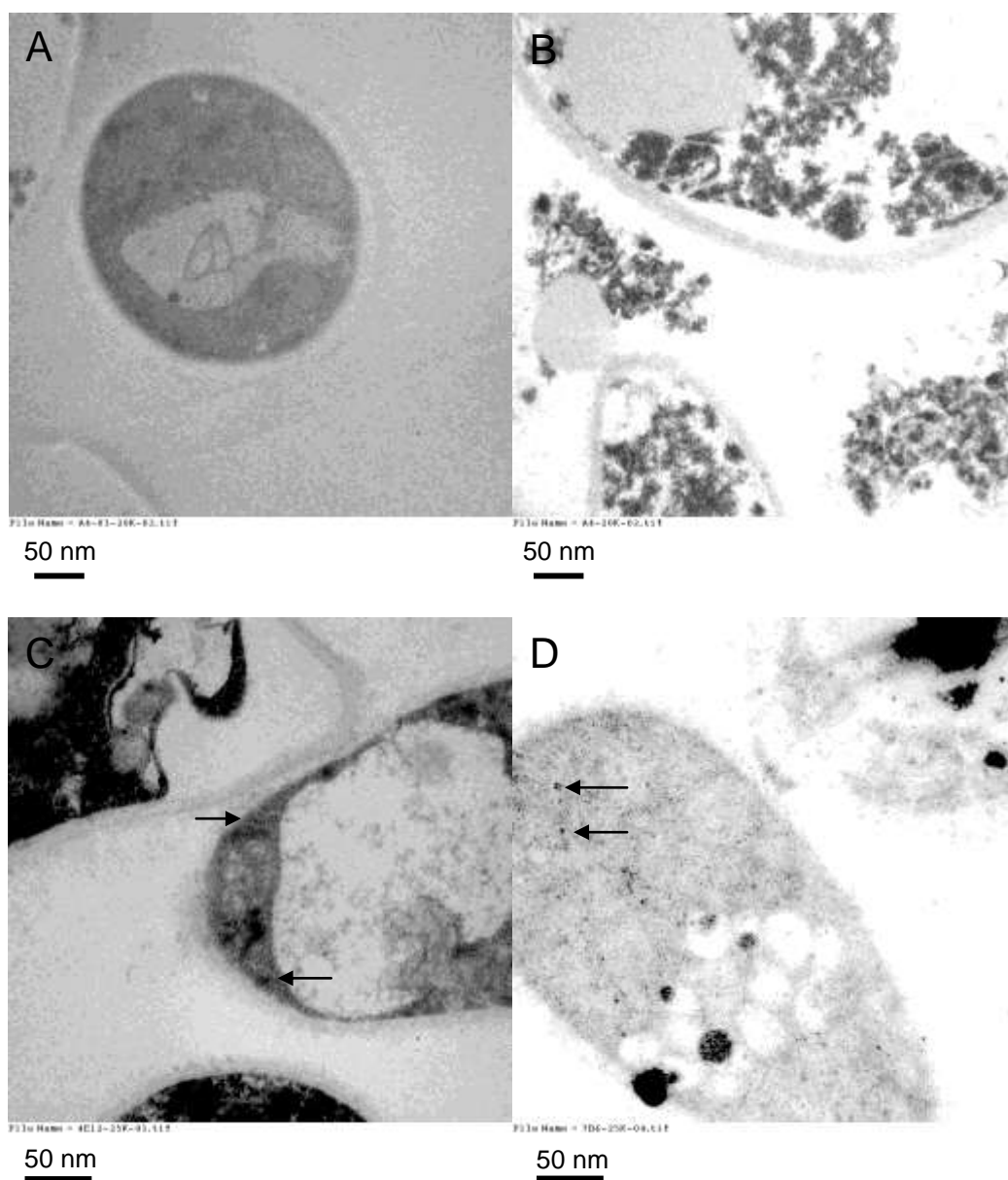
As barras indicam a média de duas leituras. Os valores são significativos em relação ao controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,005$ .

Fonte: Thomaz, 2012.

#### 4.20.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A mesma técnica descrita acima foi feita para verificar o reconhecimento dos anticorpos monoclonais – 4E12 e 7B6 - contra Hsp60 derivada de *H. capsulatum* em *P. lutzii*, isolado 01, como controle foi utilizado AcM irrelevante, A4. Podemos observar marcações internamente na levedura *P. lutzii* e não houve marcação inespecífica no controle (figura 49).

**Figura 49 – Microscopia eletrônica de transmissão.** Detecção do antígeno Hsp60 nas estruturas internas de *P. brasiliensis*, isolado 18, através dos anticorpos monoclonais gerados contra Hsp60 derivada de *H. capsulatum*.



A transmissão eletrônica mostra em (A) anticorpo irrelevante de controle (A4), (B) a levedura incubada com AcM 4E12 e em (C) incubada com AcM 7B6. Todos os anticorpos foram incubados na diluição de 1:10. Observe alguns pontos de imunomarcção (setas). Barras de escala de 4  $\mu$ m.

Fonte: Thomaz, 2012.



#### 4.21 Uso de hospedeiro inveterbrado *Galleria mellonella* como alternativa no uso de cobaias de experimentação

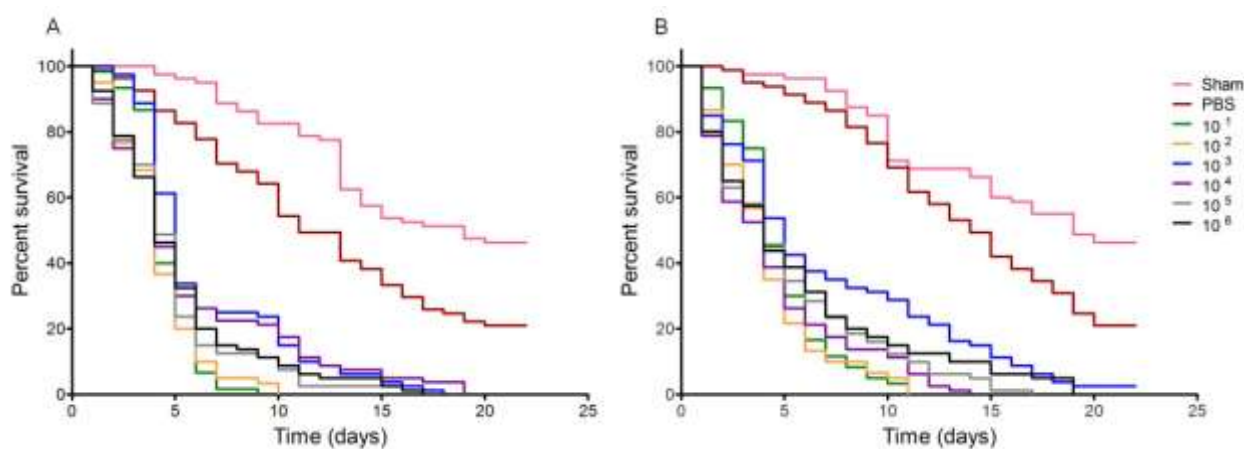
Conforme explicado anteriormente, usamos *P. lutzii* nesses ensaios porque foram realizados no laboratório do professor Joshua Nosanchuk, o qual possui autorização para manipular esse isolado ao invés do Pb18.

Devido ao uso excessivo de animais para experimentação no uso de laboratórios procuramos analisar se as leveduras de *H. capsulatum* G184 e *P. lutzii* seriam bons modelos de estudo para *Galleria mellonella*, cujo hospedeiro é invertebrado e tem sido estudado justamente no intuito de reduzir o uso de hospedeiros mamíferos.

A figura 50 e 51 mostram que tanto *P. lutzii* como *H. capsulatum* foram letais para *G. mellonella* a 25 °C e a 37 °C. Entretanto, não houve correlação entre os inóculos testados e o tempo de morte das larvas. Todas as concentrações de leveduras utilizadas reduziram significativamente a sobrevivência das larvas, quando comparadas aos controles Sham e PBS. No modelo com *P. lutzii*, a 25 °C (fig. 50A), as larvas infectadas com  $10^1$  e  $10^2$  foram mais letais, com todas as larvas mortas em 7 dias, para as demais concentrações, exceto  $10^3$  todas as larvas morreram até o dia 12, e para o inóculo  $10^3$  até o dia 15. Já para a incubação a 37°C (fig. 50B), os resultados foram semelhantes nas duas menores concentrações. E nas demais concentrações a alta temperatura, não foi significativa estatisticamente, no entanto aumentou a letalidade do inóculo, apresentando uma média de sobrevivência de 8 dias.

Resultados similares foram encontrados com *H. capsulatum* (figura 51), a 25 °C (fig 51A),  $10^1$  e  $10^2$  foram mais letais, todas as larvas morreram até o dia 7, com o inóculo de  $10^5$  morreram até o dia 11, os outros inóculos,  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  morreram até o dia 16, o qual foi significativo quando comparados aos controles. Interessantemente, os dados a 37 °C (fig. 51B) apresentaram maior letalidade, e a maior concentração,  $10^6$ , foi a mais letal, o grupo morreu até o dia 8. Enquanto todas as larvas morreram nos dias 7, 6 e 11 com os inóculos  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^5$ , respectivamente, a 25 °C, para 37 °C os dias passaram para 13, 10 e 15, nas mesmas concentrações. A média de sobrevivência de *G. mellonella*, em ambas temperaturas testadas, foi de 13 dias.

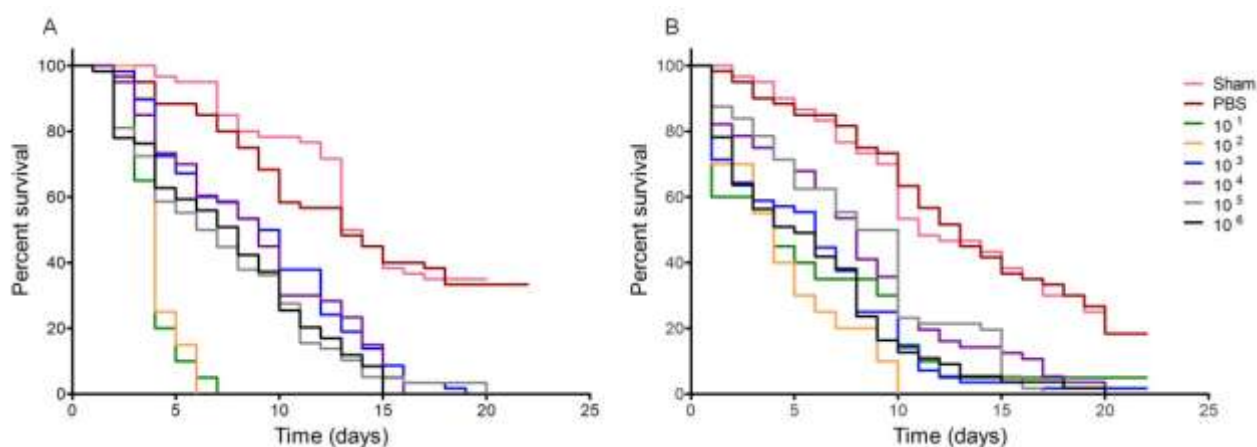
**Figura 50** - Curvas de sobrevivência da larva *G. mellonella* após infecção com diferentes concentrações de *P. lutzii*.



Fonte: Thomaz, 2012.

Em (A) *G. mellonella* infectada e incubada a 25 °C e (B) a 37 °C. Os controles incluem larvas não infectadas (Sham) e larvas infectadas e tratadas com PBS. n= 20 larvas por grupo.

**Figura 51** - Curvas de sobrevivência da larva *G. mellonella* após infecção com diferentes concentrações de *H. capsulatum* G184.



Fonte: Thomaz, 2012.

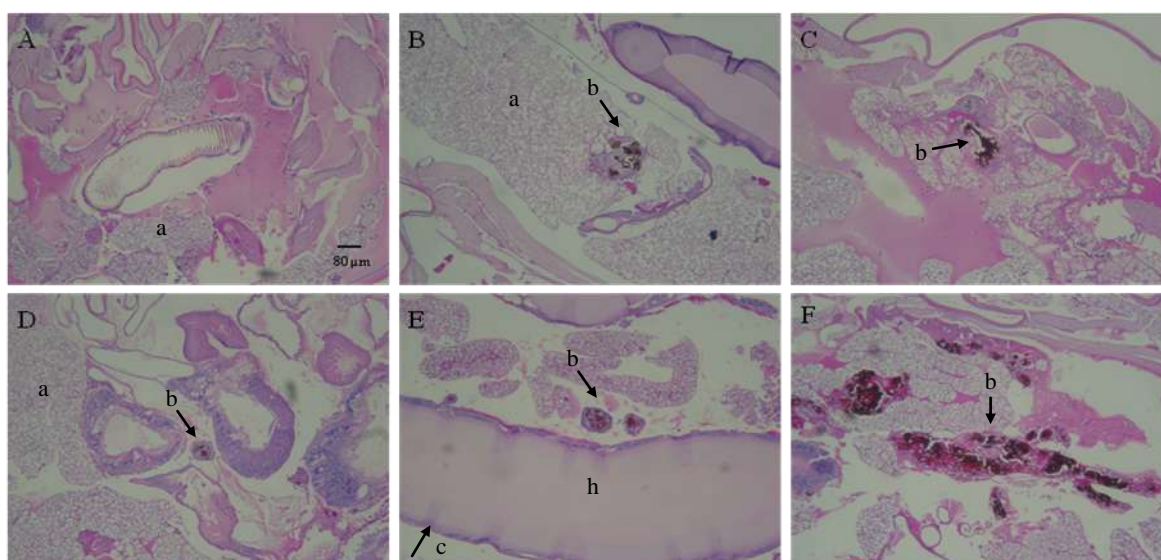
Em (A) *G. mellonella* infectada e incubada a 25 °C e (B) a 37 °C. Os controles incluem larvas não infectadas (Sham) e larvas infectadas e tratadas com PBS. n= 20 larvas por grupo.

#### 4.21.1 Histopatológico

Para melhor compreender esse modelo de infecção, as larvas de todos os inóculos para as duas condições térmicas testadas, foram fixadas em PBS-formalina 10%, após 72 horas da infecção e divididas longitudinalmente e enviadas ao setor de histologia para confecção das lâminas. As alterações no tecido de *G. mellonella* provocadas pela infecção com *P. lutzii*, em diferentes concentrações podem ser vistas na figura 52 e 53, a 25 °C e 37 °C, respectivamente. Os danos na integridade do tecido das larvas infectadas como a formação de nódulos pigmentados e a presença de estruturas semelhantes à granulomas contendo leveduras foram evidentes.

Microscopicamente, foi possível observar maior aumento no processo de melanização nos nódulos contendo leveduras a 25 °C quando comparadas as larvas infectadas e incubadas a 37 °C, conforme figuras 52 e 53.

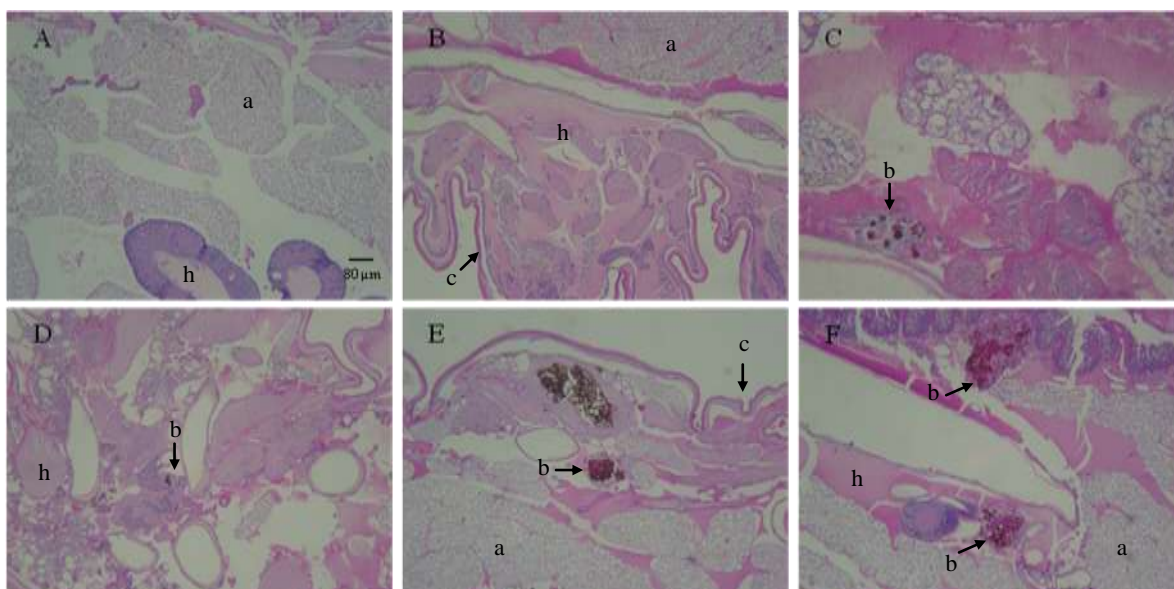
**Figura 52** - Histopatologia da larva *G. mellonella*, corada pelo método PAS.



(A) Larva infectada com 0.1 M PBS e incubada a 25 °C, (B) larva infectada com  $10^1$  leveduras de *P. lutzii*, (C)  $10^2$ , (D)  $10^3$ , (E)  $10^4$  e (F)  $10^5$  de leveduras de *P. lutzii* e incubadas a 25 °C. As estruturas indicadas são: a, corpos adiposos; b, células fúngicas; c, cutícula; h, haemolinfa. Aumento de 10x.

Fonte: Thomaz, 2012.

**Figura 53** - Histopatologia da larva *G. mellonella*, corada pelo método PAS.

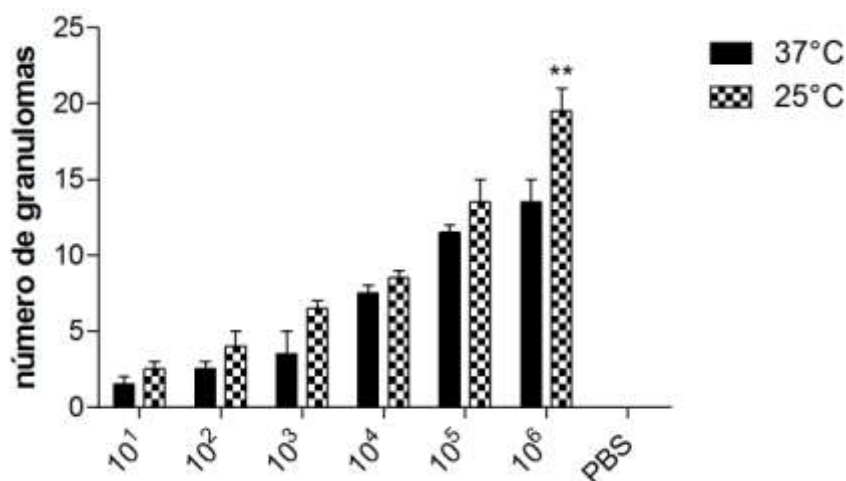


A) Larva infectada com 0.1 M PBS e incubada a 37 °C, (B) larva infectada com  $10^1$  leveduras de *P. lutzii*, (C)  $10^2$ , (D)  $10^3$ , (E)  $10^4$  e (F)  $10^5$  de leveduras de *P. lutzi* e incubadas a 37 °C. As estruturas indicadas são: a, corpos adiposos; b, células fúngicas; c, cutícula; h, haemolinfa. Aumento de 10x.

Fonte: Thomaz, 2012.

Esses dados são confirmados através da contagem dos nódulos pelo programa Image-Pro-Plus, a 25 °C e a 37 °C, mostrado na figura 54. Adicionalmente, não foram encontrados estruturas como hifas indicando a morfogênese da levedura termodimórfica quando incubada a 25 °C. Não foram encontrados nódulos e/ou estruturas como granulomas nos grupos controle. A análise do tecido mostrou correlação positiva do número de granulomas encontrados com a quantidade de inoculo usado na infecção de *G. mellonella*.

**Figura 54-** Número de estruturas semelhantes a granulomas contendo leveduras de *P. lutzii* contados nas lâminas de histologia.



A contagem foi através do programa Image-Pro-Plus. Os gráficos representam as larvas que foram incubadas a 25 °C e a 37 °C. O controle inclui larvas infectadas com PBS.

Fonte: Thomaz, 2012.

O processo de melanização faz parte do processo de resposta de hospedeiros não invertebrados, como *G. mellonella*, a micro-organismos. A melanização nas larvas infectadas, em todos os inóculos usados, é induzida dentro de poucas horas. A figura 55 e 56 retrata esse processo, após 6 horas do desafio com *H. capsulatum* a 37 °C e 25 °C, respectivamente. Os resultados foram similares para infecção com *P. lutzii*.

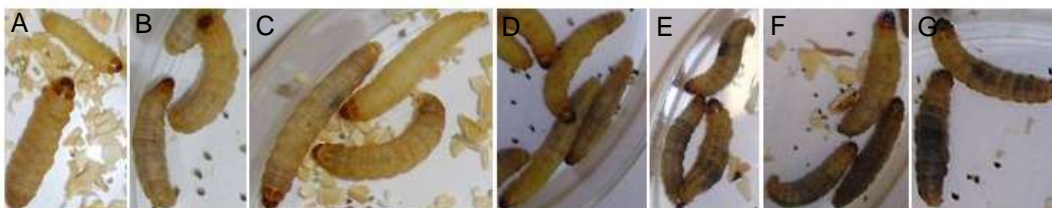
**Figura 55 -** *G. mellonella* infectada com *H. capsulatum* G184 induz o processo de melanização das larvas de forma dose dependente



Larvas infectadas com (A) PBS, (B)  $10^1$ , (C)  $10^2$ , (D)  $10^3$ , (E)  $10^4$ , (F)  $10^5$ , e (G)  $10^6$  células de *H. capsulatum*/larva. As imagens foram tiradas após 6 horas da infecção e incubadas a 37 °C.

Fonte: Thomaz, 2012.

**Figura 56** - *G. mellonella* infectada com *H. capsulatum* G184 induz o processo de melanização das larvas de forma dose dependente.



Larvas infectadas com (A) PBS, (B)  $10^1$ , (C)  $10^2$ , (D)  $10^3$ , (E)  $10^4$ , (F)  $10^5$ , e (G)  $10^6$  células de *H. capsulatum*/larva. As imagens foram tiradas após 6 horas da infecção e incubadas a 25 °C.

#### 4.21.2 Determinação da carga fúngica em *G. mellonella*

Quanto a determinação da carga fúngica presentes nas larvas não obtivemos sucesso, o crescimento de contaminantes foi excessivo, impossibilitando o crescimento das leveduras testadas, as quais demandam de mais tempo para crescer do que bactérias em geral. Faz-se necessário outras metodologias para esse fim, na literatura encontramos apenas um grupo que conseguiu isolar o agente etiológico testado, porém, com muitas adequações do protocolo.

## 5 DISCUSSÃO

Inúmeros estudos têm sido realizados de forma a buscar por alternativas e/ou adjuvantes ao tratamento clássico de infecções fúngicas como também alcançar maior entendimento no processo da patogênese de fungos de importância médica, como *P. brasiliensis*, o qual desde 2008 tornou-se de notificação para liberação de medicação anti-fúngica no Estado de São Paulo, apesar da Lei, muitos centros de referência ainda não se adaptaram a esse novo requisito. Os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais estão relacionados aos Serviços Universitários. O banco de dados do Sinan (Sistema Nacional de Agravos de Notificação) ainda não inclui a PCM, embora futuramente irá listar essa doença, permitindo dessa forma o conhecimento real dos casos diagnosticados no Brasil.

Até o presente momento não existem vacinas eficazes contra a PCM e, embora o tratamento seja bem estabelecido, particularmente com o uso de sulfametoxazol-trimetoprim, itraconazol e anfotericina B, problemas relacionados ao longo período de medicação, aos efeitos nefrotóxicos e as recidivas de pacientes infectados com *P. brasiliensis* têm estimulado o desenvolvimento de estratégias profiláticas e/ou terapêuticas eficazes contra a PCM.

O estabelecimento de terapias baseadas no uso de anticorpos monoclonais, os quais participam em todos os processos da resposta imune, ainda requer maiores investigações, uma vez que fatores que influenciam a eficácia dessas terapias ainda não estão bem esclarecidos, devido à complexidade da imunidade mediada por anticorpos.

Diante do exposto acima, nosso trabalho baseou-se na extração e purificação de alguns componentes, tais como melanina, CMH e uma glicoproteína (ainda em processo de identificação) derivada da extração alcalina de *P. brasiliensis* e a produção de anticorpos, monoclonal e policlonal contra eles e, sua avaliação no modelo de PCM experimental.

Nas últimas duas décadas alguns grupos de pesquisa têm demonstrado que os anticorpos podem modificar a infecção fúngica em benefício ou não do hospedeiro. Os anticorpos podem mediar a proteção através de ações diretas ou indiretas sobre as células fúngicas (89).

A defesa do hospedeiro contra fungos montada sob a resposta humoral, com os anticorpos sendo os personagens principais, foi considerada irrelevante durante longos anos (95) suportados por evidências de que a resposta mediada por células era essencial e unicamente responsável pela resistência nessas doenças. No entanto anticorpos monoclonais têm sido gerados, com sucesso, contra seis fungos de importância médica, *A. fumigatus* (157), *C. albicans* (31, 104, 157-161), *C. neoformans* (50, 96, 97, 100, 101, 157), *Sporothrix schenckii* (162), *H. capsulatum* (163-165) e *P. brasiliensis* (45, 93).

Nesse trabalho encontramos diversas dificuldades na tecnologia de produção de hibridomas. Mesmo nos experimentos mais eficientes de fusão celular apenas 1% das células envolvidas sofrem fusão e apenas 1 em  $10^5$  células formam híbridos viáveis (152), no entanto obtivemos um anticorpo monoespecífico de natureza IgM que nos ensaios, *in vitro*, na presença do complemento foi eficaz em aumentar a fagocitose das leveduras de *P. brasiliensis* reduzindo sua viabilidade celular, através do aumento da produção de óxido nítrico, mediador citotóxico dos macrófagos. A liberação de óxido nítrico é um importante fator para o ataque oxidativo dirigido contra diferentes patógenos (166). Apesar da IgG estar mais relacionada à modulação nas respostas, IgM desempenha papel importante na ativação do complemento. Mostramos por microscopia eletrônica que a IgM gerada reconheceu a glucosilceramida internamente do fungo, embora não tenha sido detectada na parede celular como relatado em *C. neoformans* e *Pseudallescheria boydii*. Em nosso trabalho também utilizamos anticorpo monoclonal, previamente descrito, no ensaio de imunomarcagem e, demonstramos que CMH está presente na parede e próximo aos brotamentos da célula leveduriforme, dado que corrobora para a hipótese de que essa molécula está envolvida no crescimento celular. A molécula de CMH tem sido amplamente investigada e relacionada como uma forte candidata alvo de terapia, pois está presente tanto na parede celular como em vesículas (53, 55, 167-169). Mas essas moléculas são quase ausentes em conídios de *P. boydii*, a diferenciação na expressão de CMH relativa à fase morfológica pode sugerir que o glicolípido está envolvido no processo de transformação do conídio para micélio (53).

Pacientes com criptococose produzem anticorpos contra essa molécula, tais anticorpos foram isolados e mostraram ser eficientes em inibir o crescimento e o brotamento das leveduras de *C. neoformans*. Os anticorpos contra glucosilceramida



exibem reatividade cruzada com soros de pacientes infectados com histoplasmose, aspergilose e paracoccidiodomicose, indicando que essa molécula possui similaridade entre espécies diferentes e é produzida no curso da infecção. Por microscopia eletrônica mostraram ainda que CMH está depositada em abundância na parede celular, indicando que os epitopos de CMH podem estar acessíveis nessa estrutura fúngica (50). Ligações em componentes da parede celular podem interferir na biosíntese e organização dos polímeros descritos em parede celular fúngica.

Para verificar a ação protetora do anticorpo contra CMH em modelo de paracoccidiodomicose experimental nesse trabalho, nós utilizamos o anticorpo monoclonal –  $\alpha$ -CMH, contra o antígeno extraído de *C. gloesporioides* desenvolvido em 2004 (150) em esquema profilático, 24 horas antes do desafio com leveduras de Pb18, em três diferentes protocolos em modelo murino, usando a linhagem de camundongos BALB/c. O padrão de resposta desses camundongos é conhecido como intermediário, ou seja, nesse modelo eles são capazes de manter a infecção sob controle, embora não consigam atingir a cura (170). Com 15 dias de infecção não foi observado disseminação do patógeno no tecido pulmonar em ambos os grupos estudados, controle e tratado, já aos 30 dias após a infecção o grupo tratado conteve a infecção fúngica nos pulmões, reduzindo a quantidade de unidades formadoras de colônia por grama de tecido pulmonar nos camundongos BALB/C, quando comparados ao grupo controle. E no protocolo III, aos 60 dias após a infecção o grupo tratado apresentou valor de maior significância dos três protocolos estudados. Essa diminuição da carga fúngica pode ser observada pela formação dos granulomas organizados mais densos contendo as leveduras em seu interior, consequentemente reduzindo os danos no tecido pulmonar causados pela levedura de *P. brasiliensis* nos animais tratados com o anticorpo  $\alpha$ -CMH. Os animais que foram submetidos ao tratamento com anticorpo monoclonal irrelevante exibiram na histopatologia tecido pulmonar mais inflamado, cujas lesões são mais extensivas e com leveduras dispersas no granuloma não organizado.

O estabelecimento de uma resposta protetora depende da relação entre as subpopulações de células  $T_h1$  e  $T_h2$ , o que por sua vez é determinado pela presença de citocinas no meio. A diferenciação para um perfil  $T_h1$ , resposta predominantemente celular, é induzida por IL-12 e IFN- $\gamma$ , enquanto que IL-10 e IL-4 induzem um padrão  $T_h2$ , resposta predominantemente humoral.

Com relação à polarização da resposta imune, é vastamente encontrado na literatura que a imunidade mediada por células é a responsável pela proteção a infecções fúngicas, bem como para protozoários como *Leishmania sp.* Verificamos que a secreção de IL-10 após 15 e 30 dias do desafio com leveduras de Pb18, foi drasticamente reduzida, sendo que os níveis em 15 dias foram bem visíveis. O bloqueio de IL-10 *in vivo* controla melhor a infecção em camundongos suscetíveis, B.10A (171). Os níveis de IL-4 foram baixos e parecidos no grupo tratado e não tratado, nos protocolos I e II, já o protocolo III, 60 dias após a infecção o grupo tratado com AcM  $\alpha$ -CMH reduziu os índices de IL-4. A secreção baixa dessa citocina é associada ao padrão de resposta imunológica  $T_{h1}$  e indica resistência à infecção por *P. brasiliensis*. Há uma dicotomia para IL-4, que tanto pode ser considerada protetora como exacerbadora da PCM. Em modelo murino com duas linhagens depletadas para produção de interleucina-4 os resultados foram inesperados. Em camundongos B.10A, suscetíveis à PCM experimental, a carga fúngica nos pulmões foi aumentada, indicando que a IL-4 não é o principal mediador na suscetibilidade do animal, já em camundongos C57BL/6, suscetibilidade intermediária, foi menos severa com aumento da produção de TNF- $\alpha$  e IL-12, portanto o papel da IL-4 depende do padrão genético do hospedeiro (172). Além de que quando os níveis de IL-4 e IL-5 foram reduzidos em paralelo, pouco se detectou de IgG1 quando comparados aos animais controle – com IL-4 – o contrário aconteceu com IgG2a, a qual é estimulada por IFN- $\gamma$ , polarizando a resposta para perfil  $T_{h1}$ . O AcM  $\alpha$ -CMH pertence à classe de IgG2a, o qual é descrito como inibidor de IL-4 e indutor de IFN- $\gamma$ . E podemos observar em nosso trabalho que os níveis de IFN- $\gamma$ , nos três protocolos avaliados foram significativamente maiores nos grupos que receberam 1 mg de AcM  $\alpha$ -CMH. E, os níveis dessa citocina foram aumentados em 30 dias e mais uma vez a 60 dias após a infecção com *P. brasiliensis*. Dado de extrema relevância, uma vez que IFN- $\gamma$  ativa macrófagos, cuja atividade fagocítica é potencializada. Conseqüentemente essa citocina é envolvida na resistência a essa infecção fúngica, ao contrário foi reportado, níveis baixos de IFN- $\gamma$  favoreciam a suscetibilidade à infecção por *P. brasiliensis* (173, 174)

Respostas  $T_{h1}$  e  $T_{h2}$  afetam células diferentes e influenciam o tipo da resposta imune. Outras citocinas que direcionam para a resposta celular são IL-12 e TNF- $\alpha$ . Nós não observamos diferenças nos níveis de TNF- $\alpha$  no grupo tratado e sacrificado após 15 dias da infecção, nos outros dois protocolos os índices dessa

citocina foram aumentados, porém, menores do que os dois grupos – tratado com AcM  $\alpha$ -CMH e AcM A4 (irrelevante) no protocolo I. A redução dessa citocina ao longo do curso da doença pode ser hipotetizada como devido ao controle da doença por outros mecanismos mais proeminentes. Em infecções fúngicas o TNF- $\alpha$  é encontrado em níveis menores quando há progressão do quadro clínico. O TNF estimula macrófagos a secretar citocinas, como IL-1, cuja ação é parecida ao TNF (175). A resposta é constituída por uma cascata de citocinas com atividades biológicas complementares com as demais citocinas abordadas acima. Com relação a IL-12, em nosso trabalho nós dosamos no homogenato dos pulmões de camundongos tratados com AcM irrelevante e AcM  $\alpha$ -CMH, a sua subunidade inativa, IL-12p40 e a sua forma ativa IL-12p70. A subunidade inativa é considerada antagônica a IL-12p70, e trabalhos sugerem papel diferente entre elas (176). Não vimos diferença estatística nos níveis de IL-12p40 nos três protocolos, no entanto após 15 dias os níveis foram bem altos quando comparados aos grupos de 30 e 60 dias, em ambos os grupos, e inversamente encontramos para IL-12p70, seu índice foi aumentando ao longo dos dias, atingindo o valor mais alto no protocolo III. E em todos os protocolos os grupos tratados com o AcM  $\alpha$ -CMH aumentaram sua secreção.

O contato prévio do AcM  $\alpha$ -CMH, isotipo IgG2a, modulou a resposta mediada por citocinas através da inibição da síntese de IL-10, indução de IFN- $\gamma$ , IL-12p70 e TNF- $\alpha$ , polarizando dessa forma o perfil da resposta imunológica montada frente ao desafio com leveduras de *P. brasiliensis*. Esses dados são de extrema importância, uma vez que foi dado como tratamento um anticorpo monoclonal mostrando que a imunidade mediada por anticorpos pode levar ao controle da infecção por *P. brasiliensis*, em modelo profilático da doença experimental.

Verificamos também nesse trabalho o papel de dois anticorpos monoclonais contra Hsp60 derivado de *H. capsulatum*. Proteínas de choque térmico, conhecidas como Hsp (heat shock protein) são amplamente distribuídas na natureza e altamente conservadas em uma gama de micro-organismos, desempenham papel protetor, aumentando a sobrevivência celular sobre condições de estresse fisiológico (177). Além disso as Hsps são reconhecidas como importantes moléculas na modulação do sistema imune (178).

De acordo com Long (179) Hsp60 é uma das moléculas mais bem caracterizadas na superfície de *H. capsulatum* var. *capsulatum* e interagem

especificamente com CD11b/CD18 (CR3) nos macrófagos, facilitando a internalização das leveduras.

A vacinação com Hsp60 recombinante em camundongos, por via intranasal, conferiu proteção contra a infecção por *H. capsulatum*, sendo essa atribuída a resposta imune celular (82). Guimarães e outros (163) também em modelo de histoplasmose murina mostraram que diferentes anticorpos modificam a patogênese da doença, o anticorpo 7B6, isotipo IgG2b, não aumentou a formação de fagolisossomos, induziu maior inflamação nos tecidos e elevou os níveis de IL-4 e IL-10, o contrário foi demonstrado para os anticorpos de isotipo IgG1 e IgG2a (4E12), os quais prolongaram a sobrevivência dos camundongos. Esses isotipos reduziram a carga fúngica no órgão primariamente acometido pelas leveduras de *H. capsulatum*, reduziram a inflamação e em partes polarizaram a resposta imunológica do hospedeiro para T<sub>h</sub>1, com aumento de IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$ , as quais possuem papel fundamental no controle da infecção.

Cunha e outros (86) mostraram que a Hsp60 recombinante de *P. brasiliensis* foi reconhecida por 72 soros de um total de 75 pacientes com PCM e a sugerem como opção para teste diagnóstico. A Hsp60 de *P. brasiliensis* apresenta grande homologia com a mesma proteína de *H. capsulatum* (180).

Nosso grupo desenvolveu vetor contendo inserto de Hsp60, a vacina foi administrada via subcutânea em camundongos infectados, e mostrou-se ser eficiente na redução da carga fúngica nos pulmões dos animais e indução das citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  (Rittner et al, dados não publicados). A associação desse vetor a outro vetor contendo inserto do P10, exibiu maior proteção ao hospedeiro animal quando comparado ao vetor contendo somente Hsp60, e ainda foi encontrado maiores níveis de IgG2a e IgG1, o que corrobora para a hipótese de que essa proteína pode modular a resposta imune para T<sub>h</sub>1, controlando a infecção por *P. brasiliensis* (181). O peptídeo 10, indutor de IFN- $\gamma$ , têm sido amplamente investigado, uma vez que sua proteção é demonstrada com efeito aditivo a drogas antifúngicas de escolha no tratamento da PCM (182, 183).

Em nosso trabalho, usamos os anticorpos monoclonais 7B6 e 4E12 frente ao desafio com as leveduras de *P. lutzii*, em modelo profilático. O grupo de animais que recebeu o AcM 7B6, IgG2b, exibiu granuloma mal organizado com as leveduras dispersas pelo tecido pulmonar, mas esse anticorpo mostrou ser eficiente em reduzir a carga fúngica nos pulmões. O contrário foi visto no grupo que recebeu o AcM

4E12, IgG2a, granuloma organizado contendo em seu interior as leveduras de *P. lutzii*, exibindo o menor número de unidades formadoras de colônia por grama de tecido pulmonar, quando comparados ao grupo controle, tratado com anticorpo irrelevante. Não observamos disseminação nos outros órgãos primariamente acometidos pelas leveduras do gênero *Paracoccidioides*, fígado e baço, embora 15 dias de infecção seja um período curto para se observar alastramento do agente infeccioso.

Como relatamos durante todo nosso trabalho, o controle da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii* depende também do caminho escolhido da resposta imune pelas suas proteínas envolvidas nas respostas de padrão  $T_{h1}$  e  $T_{h2}$ .

Observamos que os animais tratados tanto com 7B6 e 4E12 reduziram os níveis de IL4 e IL-10 quando comparados ao grupo controle, e o AcM 4E12 foi o que apresentou os menores índices das citocinas. A IL-10, conhecida como citocina imunoreguladora, é produzida principalmente por macrófagos ativados, sendo um exemplo de *feedback* negativo, e é antagonista de IL12. Com relação aos valores de IL-12p40 e IL-12p70, a subunidade inativa – IL12p40 foi aumentada somente no grupo que recebeu 7B6 e os animais que receberam 4E12 apresentaram maiores índices da forma ativa – IL-12p70, quando comparados ao grupo controle. O mesmo pode-se observar com os níveis de IFN- $\gamma$ , significativamente maiores, e o grupo tratado com 7B6 também estimulou a síntese dessa citocina, porém, menos do que quando comparado ao grupo tratado com 4E12. Essa secreção elevada no grupo que recebeu AcM 4E12 demonstra que o isotipo IgG2a estimula a produção, fato já que era esperado.

Ainda com esses anticorpos monoclonais avaliamos o seu potencial fagocítico em duas concentrações, 10  $\mu$ g e 50  $\mu$ g/ml e observamos que ambos os AcMs aumentaram o índice de fagocitose e o efeito superior foi exibido na maior concentração, para ambos os anticorpos, e mais ainda, o AcM 4E12 apresentou maior valor significativo, o que corrobora para os resultados *in vivo*, pois esse anticorpo monoclonal conferiu maior proteção aos animais infectados com *P. lutzii* quando comparado ao anticorpo monoclonal 7B6, fato também já esperado, pois o isotipo IgG2b não conferiu proteção ao modelo de histoplasmose (163).

A análise por imunomarcação demonstrou que os anticorpos monoclonais contra Hsp60 de *H. capsulatum* reconheceram componentes de *P. lutzii*, demonstrando que essas moléculas são conservadas entre algumas espécies,

sendo uma molécula alvo para o direcionamento terapêutico de alguns fungos de importância médica.

O efeito de um anticorpo monoclonal depende de diversos fatores, incluindo o antígeno alvo e sua função, a densidade da superfície celular e características intrínsecas do AcM, o que inclui especificidade, avidéz e isotipo (90, 184, 185).

Diferenças entre anticorpos policlonais e monoclonais são relatadas em investigações do papel biológico dos anticorpos, uma vez que preparações policlonais podem conter imunoglobulinas antagonistas, diferentes proporções de cada anticorpo o que dificulta na análise referente a atribuições das funções de cada molécula a ser analisada. Com o advento da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais essas questões têm sido bem explanadas. No presente trabalho nos deparamos com diversos entraves na obtenção dos hibridomas e por isso utilizamos em nosso ensaios anticorpo policlonal contra melanina, produzido em camundongos da linhagem BALB/c .

Nosso grupo anteriormente comprovou que melanina comporta-se como fator de proteção a leveduras de *P. brasiliensis*, reduzindo a suscetibilidade da levedura a determinados antifúngicos (186).

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem causar impacto no crescimento fúngico. A ação dos macrófagos em eliminar patógenos invasores ocorre pela liberação de substâncias que participam da ativação do processo de digestão dos micro-organismos no interior dos macrófagos. A preparação com anticorpos policlonais obtidos contra melanina foi testado *in vitro*. Em ensaio de fagocitose os anticorpos aumentaram a capacidade fagocítica dos macrófagos em internalizar e matar as leveduras, uma vez que no ensaio de viabilidade celular o número de unidades formadoras de colônia foi drasticamente reduzido, quando comparados aos seus respectivos controles. A mistura continha tanto IgM como IgG, então utilizamos como controles anticorpos irrelevantes dos isotipos IgM e IgG na presença e ausência de soro. Não observamos diferença estatística quando usamos os anticorpos policlonais na presença e ausência do soro, mostrando que a preparação policlonal sozinha foi eficiente em matar leveduras de Pb18.

Em síntese, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que os anticorpos monoclonais direcionados contra CMH e Hsp60 auxiliam na imunidade celular, regulando uma resposta efetora frente à infecção por leveduras do gênero

*Paracoccidioides* e, os anticorpos policlonais contra melanina potencializam os efeitos fungicidas dos macrófagos.

Sabe-se que a superfície fúngica é rica em glicoconjugados, em especial os que contém em sua composição unidades de manose, que são moléculas importantes para a interação com o hospedeiro (187). Sabe-se também que diversos fungos são capazes de aderir e invadir células epiteliais e que este mecanismo pode ser essencial no curso da infecção pelos micro-organismos (188). No presente trabalho extraímos, por hidrólise alcalina, uma glicoproteína, cuja caracterização biológica será realizada posteriormente. Sabemos que essa glicoproteína é presente em larga escala por esse método de extração, sua porção de carboidrato apresentou fucose, manose, galactose e glucose, semelhante a porção polissacarídica da gp55 derivada de *P. brasiliensis* isolado 339 (70). O diâmetro médio dessa molécula foi de 150 nm, e pequenas partículas são significativamente mais hábeis em promover resposta celular tipo 1 (189). Seu potencial zeta foi característico de suspensões coloidais estáveis, e a caracterização dessa glicoproteína está sendo realizada por nosso grupo. Acreditamos que essa molécula seja importante, dado a reprodutibilidade nas extrações e quantidade de amostra extraída, como nosso objetivo era a produção de anticorpos monoclonais, usamos essa glicoproteína apenas para obtenção de hibridomas, nesse trabalho. Ressaltamos que essa molécula pode ser um antígeno, cuja importância ainda é desconhecida.

Os protocolos de imunização com adjuvantes mais rotineiramente empregados – Freund e Alumen, não funcionaram, nem quando conjugamos a molécula com KLH ou com BSA, no entanto quando usamos o adjuvante Quil A – saponina - obtivemos produção de anticorpos nos animais imunizados com a glicoproteína e esse adjuvante. Adjuvantes do tipo saponina tem demonstrado bons resultados para estimular o sistema imune, através de diversos caminhos, entre eles o estímulo de linfócitos CD8+ e proliferação de outras subpopulações linfocitárias, aumento da produção de citocinas e regulação da resposta imune humoral (190). Obtivemos 15 clones do isotipo IgM, dos quais 2 clones foram utilizados na técnica de imunomarcção, e os anticorpos não reconheceram nenhuma estrutura da levedura de *P. brasiliensis*, fato esperado, uma vez que é bem relatado que na obtenção de anticorpos monoclonais, muitos clones gerados são inespecíficos (Siu-Kei Chow, 2011, dados não publicados), e obtivemos 1 clone de isotipo IgG1, o qual reconheceu estruturas internas e a parede celular da levedura pela mesma técnica.

Estamos produzindo maior quantidade desse anticorpo monoclonal para utilizarmos nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, na proteção da PCM experimental. Além de termos como objetivo avaliarmos o papel desse antígeno-anticorpo monoclonal.

O entendimento da expressão, função e regulação do grupo total de moléculas em um sistema celular é um grande desafio. No caso de fungos, o conhecimento de glicoconjugados, glicoproteínas pode fornecer importantes informações sobre mecanismos de interação com o hospedeiro, patogênese e apontar novos alvos para agentes antifúngicos.

Há uma grande diversidade de trabalhos que estuda a PCM e a histoplasmose em modelo animal, nosso grupo é um exemplo. A utilização de animais em pesquisas científicas é muito ampla, e esse assunto é polêmico, haja vista o número crescente de ativistas contra essa prática que considera o uso de cobaias obsoleto, agressivo contra outros seres vivos. Em busca de métodos alternativos procuramos nesse trabalho avaliar se a larva *Galleria mellonella* seria um bom modelo de hospedeiro invertebrado para a infecção com leveduras dimórficas tais como *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides lutzii*.

Outros invertebrados têm sido utilizados na investigação patógeno-hospedeiro, tais como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Acanthamoeba castellanii* e *Dictyostelium discoideum* e *G. mellonella*, os quais possuem barreiras físicas, mecanismos celulares e moleculares na resposta imune contra algum patógeno (120). Todavia esses modelos necessitam ser cautelosamente analisados buscando semelhanças entre o funcionamento do organismo dos mamíferos frente a infecções.

No presente trabalho mostramos que as leveduras de *H. capsulatum* e *P. lutzii* são letais para a *G. mellonella*, embora não tenhamos visto correlação entre a concentração dos inóculos com o tempo de sobrevivência das larvas e, não observamos mudança de fase de levedura para micélio quando as larvas foram incubadas a 25°C. Ressaltamos que para essas leveduras se converterem é necessário um grande período, o qual não seria possível analisar nesse modelo, uma vez que usamos a larva em sua última fase antes da transformação em pulpa. Há uma controvérsia com relação ao tempo de duração das fases em *G. mellonella*, observamos em nossos ensaios que após 18 dias elas começam a transformar-se, por isso é necessário o uso de uma grande quantidade de amostragem. No intuito de compreender os danos teciduais causados pelos fungos analisamos por



histotologia as larvas infectadas e, podemos visualizar leveduras no interior da larva e ao seu redor o recrutamento de algumas células que aparentemente tentam conter a disseminação das leveduras, o que nos levou a hipotetizar que seria uma estrutura semelhante a um granuloma, mas não um granuloma verdadeiro, o qual observamos nos experimentos com mamíferos e em pacientes, uma vez que PCM é uma doença de caráter granulomatoso. Os danos teciduais foram proporcionais à concentração do inóculo usado e foi visto mais leveduras nas larvas que foram incubadas a 25 °C.

O sistema de defesa dos insetos é composto por barreiras estruturais passivas e por respostas ativas contra elementos que alcançam a sua hemocele (191). Compreende-se como barreiras estruturais o rígido exoesqueleto, o sistema digestório e as barreiras respiratórias, que constituem a primeira linha de defesa dos insetos (130).

Os insetos cicatrizam rapidamente suas feridas causadas por trauma ou invasão por parasitas, impedindo a perda fatal de fluidos biológicos, esse processo envolve aglutinação ou coagulação celular e do plasma. Os hemócitos constituem a barreira final do sistema de defesa dos insetos, atuando na coagulação, na cicatrização, na fagocitose, em respostas do tipo encapsulação e nodulação, fatores antimicrobianos naturais, como proteínas e peptídeos microbicidas e fatores bioquímicos, que são respostas coordenadas diretamente ou indiretamente pelos vários tipos de hemócitos, presentes na hemolinfa (191). A cascata pro-fenoloxidase é ativada durante a resposta, ocorrendo a oxidação de compostos fenólicos presentes na hemolinfa e na cutícula dos insetos, o produto final da oxidação é a melanina, cuja participação é diretamente sobre a esclerotização da cutícula, cicatrização das feridas e defesas imunológicas, essa cascata pode ser ativada na presença de glucanas, componente da parede celular de fungos (192). Nós fotografamos as larvas após 6 horas de infecção com *H. capsulatum* e *P. lutzii* e pudemos ver que a melanização aumenta de acordo com a maior concentração das leveduras.

Maiores estudos são necessários para determinar se *G. mellonella* pode ser um modelo alternativo de estudo para essas micoses sistêmicas, planejamos avaliar quais células estão envolvidas na resposta, através de citometria de fluxo, e ainda queremos determinar a atividade de fenoloxidasas, no entanto estamos buscando fornecedor desse tipo de inseto no Brasil, uma vez que os experimentos com *G. mellonella* foram realizados nos Estados Unidos. É importante salientar que a busca

por alternativas não exclui o uso de animais de experimentação, o avanço mais real seria a redução dos animais, por exemplo, fazer uma seleção prévia de alguns peptídeos com ação fungicida *in vitro* antes de testá-los em mamíferos.

## 6 CONCLUSÃO

- ✓ A transferência passiva do anticorpo monoclonal  $\alpha$ -CMH (IgG2a) dirigido ao antígeno CMH, em modelo profilático da PCM experimental, reduziu a carga fúngica dos pulmões e os danos teciduais dos animais infectados e induziu a secreção de IFN- $\gamma$ , IL-12p70 e TNF- $\alpha$ , modulando a resposta imune para a T<sub>h</sub>1. Por microscopia eletrônica mostramos que moléculas de CMH são acessíveis na levedura.
- ✓ A transferência passiva dos anticorpos monoclonais 4E12 (IgG2a) e 7B6 (IgG2b) dirigidos a Hsp60, reduziu a carga fúngica dos pulmões, sendo que o AcM 4E12 apresentou maior significância e induziu a secreção de IL-12p70 e IFN- $\gamma$ , e mais uma vez os níveis das citocinas foram maiores quando tratados com o AcM 4E12 frente a leveduras de *P. lutzii*. Por microscopia eletrônica mostramos que proteínas Hsp60 são acessíveis na levedura.
- ✓ Anticorpos policlonais, contendo IgM e IgG, contra melanina e anticorpo monoespecífico de isotipo IgM gerado contra CMH aumentaram a capacidade dos macrófagos J.774.17 em internalizar e fagocitar leveduras de Pb18.
- ✓ O anticorpo monoclonal de isotipo IgG1 contra glicoproteína derivada de *P. brasiliensis*, isolado 18, reconheceu por técnica de imunomarcção a parede celular da levedura.
- ✓ O modelo alternativo proposto para a redução do número de camundongos utilizados para PCM e histoplasmosse experimental apresentou semelhanças quanto a estrutura de granuloma formado no interior do hospedeiro invertebrado, *G. mellonella*, embora experimentos complementares devam ser realizados para confirmar que esse modelo tem potencial.

## REFERÊNCIAS\*

1. San-Blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 2002 Jun;40(3):225-42.
2. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 2006 Jan;23(1):65-73.
3. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009 Aug;52(2):273-83.
4. Hahn RC, Macedo AM, Fontes CJ, Batista RD, Santos NL, Hamdan JS. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 2003 Jul;41(7):2849-54.
5. Nino-Vega GA, Munro CA, San-Blas G, Gooday GW, Gow NA. Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2000 Feb;38(1):31-9.
6. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, da Silva Lacaz C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol.* 2000 Jun;38(3):185-91.
7. Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol.* 1998 Feb;36(1):37-42.
8. Negroni P. [The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina]. *Prensa Med Argent.* 1966 Sep 30;53(39):2381-2.
9. De Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia.* 1971 Nov;9(3):248-53.
10. Ferreira MS, Freitas LH, Lacaz C S, Del Negro GM, de Melo NT, Garcia NM, et al. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. *J Med Vet Mycol.* 1990;28(3):253-6.
11. Naiff RD, Ferreira LC, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. [Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986 Jan-Feb;28(1):19-27.

\*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

12. Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, de Camargo ZP, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasybus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Apr;58(4):505-12.
13. Corredor GG, Castano JH, Peralta LA, Diez S, Arango M, McEwen J, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasybus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol.* 1999 Dec;16(4):216-20.
14. Vergara ML, Martinez R. Role of the armadillo *Dasybus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 1998;144(3):131-3.
15. Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol.* 2001 Jun;39(3):233-41.
16. Johnson WD, Lang CM. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet Pathol.* 1977 Jul;14(4):368-71.
17. Restrepo BI, McEwen JG, Salazar ME, Restrepo A. Morphological development of the conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *J Med Vet Mycol.* 1986 Aug;24(4):337-9.
18. San-Blas G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1993;31(2):99-113.
19. Almeida IC, Neville DC, Mehlert A, Treumann A, Ferguson MA, Previato JO, et al. Structure of the N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glycobiology.* 1996 Jul;6(5):507-15.
20. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho Fde Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006 May-Jun;39(3):297-310.
21. Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Dec;80(24):7659-63.
22. Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* 1972 Apr;110(1):208-18.
23. Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE, Rodriguez J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* 1969 Mar;97(3):1036-41.
24. San-Blas G, San-Blas F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia.* 1977 Dec 16;62(2):77-86.

25. Chihara G, Maeda YY, Hamuro J. Current status and perspectives of immunomodulators of microbial origin. *Int J Tissue React.* 1982;4(3):207-25.
26. Bittencourt VC, Figueiredo RT, da Silva RB, Mourao-Sa DS, Fernandez PL, Sasaki GL, et al. An alpha-glucan of *Pseudallescheria boydii* is involved in fungal phagocytosis and Toll-like receptor activation. *J Biol Chem.* 2006 Aug 11;281(32):22614-23.
27. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004 Feb;16(1):3-9.
28. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.
29. Thompson JR, Douglas CM, Li W, Jue CK, Pramanik B, Yuan X, et al. A glucan synthase FKS1 homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *J Bacteriol.* 1999 Jan;181(2):444-53.
30. Cassone A, Torosantucci A. Opportunistic fungi and fungal infections: the challenge of a single, general antifungal vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2006 Dec;5(6):859-67.
31. Torosantucci A, Bromuro C, Chiani P, De Bernardis F, Berti F, Galli C, et al. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med.* 2005 Sep 5;202(5):597-606.
32. Rachini A, Pietrella D, Lupo P, Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, 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.* 2007 Nov;75(11):5085-94.
33. Anjos AR, Calvi SA, Ferracini R, Peracoli MT, Silva CL, Soares AM. Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. *Med Mycol.* 2002 Aug;40(4):377-82.
34. Xiao Z, Trincado CA, Murtaugh MP. Beta-glucan enhancement of T cell IFNgamma response in swine. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004 Dec 8;102(3):315-20.
35. Polak A, Dixon DM. Loss of melanin in *Wangiella dermatitidis* does not result in greater susceptibility to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 Sep;33(9):1639-40.
36. Wheeler MH, Bell AA. Melanins and their importance in pathogenic fungi. *Curr Top Med Mycol.* 1988;2:338-87.

37. Alviano CS, Farbiarz SR, De Souza W, Angluster J, Travassos LR. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *J Gen Microbiol.* 1991 Apr;137(4):837-44.
38. Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres-Guerrero H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun.* 2000 Jun;68(6):3696-703.
39. Nosanchuk JD, Gomez BL, Youngchim S, Diez S, Aisen P, Zancope-Oliveira RM, et al. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun.* 2002 Sep;70(9):5124-31.
40. Nosanchuk JD, Yu JJ, Hung CY, Casadevall A, Cole GT. *Coccidioides posadasii* produces melanin in vitro and during infection. *Fungal Genet Biol.* 2007 Jun;44(6):517-20.
41. Nosanchuk JD, van Duin D, Mandal P, Aisen P, Legendre AM, Casadevall A. *Blastomyces dermatitidis* produces melanin in vitro and during infection. *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Oct 1;239(1):187-93.
42. Youngchim S, Morris-Jones R, Hay RJ, Hamilton AJ. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol.* 2004 Mar;53(Pt 3):175-81.
43. Gomez BL, Nosanchuk JD, Diez S, Youngchim S, Aisen P, Cano LE, et al. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. *Infect Immun.* 2001 Sep;69(9):5760-7.
44. Kwon-Chung KJ, Rhodes JC. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 1986 Jan;51(1):218-23.
45. da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Tabora CP. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect.* 2006 Jan;8(1):197-205.
46. Barreto-Bergter E, Pinto MR, Rodrigues ML. Structure and biological functions of fungal cerebroside. *An Acad Bras Cienc.* 2004 Mar;76(1):67-84.
47. Warnecke D, Heinz E. Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell Mol Life Sci.* 2003 May;60(5):919-41.
48. Toledo MS, Suzuki E, Straus AH, Takahashi HK. Glycolipids from *Paracoccidioides brasiliensis*. Isolation of a galactofuranose-containing glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1995 Jul-Aug;33(4):247-51.

49. Takahashi HK, Lavery SB, Toledo MS, Suzuki E, Salyan ME, Hakomori S, et al. Isolation and possible composition of glucosylceramides from *Paracoccidioides brasiliensis*. Braz J Med Biol Res. 1996 Nov;29(11):1441-4.
50. Rodrigues ML, Travassos LR, Miranda KR, Franzen AJ, Rozental S, de Souza W, et al. Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. Infect Immun. 2000 Dec;68(12):7049-60.
51. Lavery SB, Momany M, Lindsey R, Toledo MS, Shayman JA, Fuller M, et al. Disruption of the glucosylceramide biosynthetic pathway in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* by inhibitors of UDP-Glc:ceramide glucosyltransferase strongly affects spore germination, cell cycle, and hyphal growth. FEBS Lett. 2002 Aug 14;525(1-3):59-64.
52. Nimrichter L, Cerqueira MD, Leitao EA, Miranda K, Nakayasu ES, Almeida SR, et al. Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. Infect Immun. 2005 Dec;73(12):7860-8.
53. Pinto MR, Rodrigues ML, Travassos LR, Haido RM, Wait R, Barreto-Bergter E. Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. Glycobiology. 2002 Apr;12(4):251-60.
54. Silva CJ. Lipídios bioativos na paracoccidioidomicose: reconhecimento por anticorpos e interação com macrófagos. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.
55. Bertini S, Colombo AL, Takahashi HK, Straus AH. Expression of antibodies directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of paracoccidioidomycosis treatment. Clin Vaccine Immunol. 2007 Feb;14(2):150-6.
56. San-Blas G, San-Blas F. Antigenic structure of *Paracoccidioides brasiliensis*. Immunol Ser. 1989;47:171-92.
57. Puccia R, Takaoka DT, Travassos LR. Purification of the 43 kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). J Med Vet Mycol. 1991;29(1):57-60.
58. Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, Franco M, Travassos LR. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. Infect Immun. 1998 Feb;66(2):786-93.
59. Travassos LR, Puccia R, Cisalpino P, Taborda C, Rodrigues EG, Rodrigues M, et al. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. Arch Med Res. 1995 Autumn;26(3):297-304.
60. Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos LR, et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface



glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 1994 Apr;62(4):1465-9.

61. Diniz SN, Carvalho KC, Cisalpino PS, Silveira JF, Travassos LR, Puccia R. Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological reactivity of the recombinant fusion proteins. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Nov;9(6):1200-4.

62. Mendes-Giannini MJ, Andreotti PF, Vincenzi LR, da Silva JL, Lenzi HL, Benard G, et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 2006 May;8(6):1550-9.

63. de Almeida SR, de Moraes JZ, de Camargo ZP, Gesztesi JL, Mariano M, Lopes JD. Pattern of immune response to GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol.* 1998 Nov 25;190(1):68-76.

64. Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol.* 1991 Aug;29(8):1610-5.

65. Gesztesi JL, Puccia R, Travassos LR, Vicentini AP, de Moraes JZ, Franco MF, et al. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. *Hybridoma.* 1996 Dec;15(6):415-22.

66. Mendes-Giannini MJ, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VL, Escalante ED, et al. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol.* 2000;38 Suppl 1:113-23.

67. Andreotti PF, Monteiro da Silva JL, Bailao AM, Soares CM, Benard G, Soares CP, et al. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 2005 May;7(5-6):875-81.

68. Flavia Popi AF, Lopes JD, Mariano M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol.* 2002 Jul-Aug;218(1-2):87-94.

69. Hanna SA, Monteiro da Silva JL, Giannini MJ. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect.* 2000 Jul;2(8):877-84.

70. Puccia R, Schenkman S, Gorin PA, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun.* 1986 Jul;53(1):199-206.

71. Benard G, Mendes-Giannini MJ, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJ. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two

*Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. J Infect Dis. 1997 May;175(5):1263-7.

72. de Mattos Grosso D, de Almeida SR, Mariano M, Lopes JD. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. Infect Immun. 2003 Nov;71(11):6534-42.

73. Lindquist S. The heat-shock response. Annu Rev Biochem. 1986;55:1151-91.

74. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet. 1988;22:631-77.

75. Yang XD, Feige U. Heat shock proteins in autoimmune disease. From causative antigen to specific therapy? Experientia. 1992 Jul 15;48(7):650-6.

76. Birk OS, Elias D, Weiss AS, Rosen A, van-der Zee R, Walker MD, et al. NOD mouse diabetes: the ubiquitous mouse hsp60 is a beta-cell target antigen of autoimmune T cells. J Autoimmun. 1996 Apr;9(2):159-66.

77. Wick G. Atherosclerosis--an autoimmune disease due to an immune reaction against heat-shock protein 60. Herz. 2000 Mar;25(2):87-90.

78. Noll A, Autenrieth I. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* HSP60 immunostimulating complexes or *Yersinia* HSP60 plus interleukin-12. Infect Immun. 1996 Aug;64(8):2955-61.

79. Nomaguchi H, Mukai T, Takeshita F, Matsuoka M, Maeda Y, Aye TM, et al. Effect of hsp65 DNA vaccination carrying immunostimulatory DNA sequences (CpG motifs) against *Mycobacterium leprae* multiplication in mice. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 2002 Sep;70(3):182-90.

80. Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. Nat Med. 1996 Aug;2(8):888-92.

81. Hornef MW, Noll A, Schirmbeck R, Reimann J, Autenrieth IB. DNA vaccination using coexpression of cytokine genes with a bacterial gene encoding a 60-kDa heat shock protein. Med Microbiol Immunol. 2000 Nov;189(2):97-104.

82. Gomez FJ, Allendoerfer R, Deepe Jr GS. Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis. Infect Immun. 1995 Jul;63(7):2587-95.

83. Cain JA, Deepe Jr GS. Evolution of the primary immune response to *Histoplasma capsulatum* in murine lung. Infect Immun. 1998 Apr;66(4):1473-81.

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

85. de Bastos Ascenco Soares R, Gomez FJ, de Almeida Soares CM, Deepe GS, Jr. Vaccination with heat shock protein 60 induces a protective immune response against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection. *Infect Immun*. 2008 Sep;76(9):4214-21.
86. Cunha DA, Zancoppe-Oliveira RM, Sueli M, Felipe S, Salem-Izacc SM, Deepe GS, Jr., et al. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Mar;9(2):374-7.
87. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1987 Apr-Jun;20(2):129-32.
88. Calich VL, Vaz CA, Burger E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol*. 1998 May-Jun;149(4-5):407-17; discussion 99-500.
89. Casadevall A, Pirofski LA. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. *Cell Host Microbe*. 2012 May 17;11(5):447-56.
90. Casadevall A, Dadachova E, Pirofski LA. Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Sep;2(9):695-703.
91. Baida H, Biselli PJ, Juvenale M, Del Negro GM, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, et al. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*. 1999 Apr;1(4):273-8.
92. Mamoni RL, Nouer SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2002 Apr;40(2):153-9.
93. Buissa-Filho R, Puccia R, Marques AF, Pinto FA, Munoz JE, Nosanchuk JD, 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*. 2008 Jul;76(7):3321-8.
94. Scavone R, Burger E. Paracoccidioidomycosis: reduction in fungal load and abrogation of delayed-type hypersensitivity anergy in susceptible inbred mice submitted to therapy with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Med Microbiol Immunol*. 2004 Feb;193(1):53-9.
95. Casadevall A. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect Immun*. 1995 Nov;63(11):4211-8.
96. Dromer F, Charreire J, Contrepolis A, Carbon C, Yeni P. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody. *Infect Immun*. 1987 Mar;55(3):749-52.

97. Mukherjee J, Scharff MD, Casadevall A. Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1992 Nov;60(11):4534-41.
98. Nussbaum G, Yuan R, Casadevall A, Scharff MD. Immunoglobulin G3 blocking antibodies to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med*. 1996 Apr 1;183(4):1905-9.
99. Yuan R, Casadevall A, Spira G, Scharff MD. Isotype switching from IgG3 to IgG1 converts a nonprotective murine antibody to *Cryptococcus neoformans* into a protective antibody. *J Immunol*. 1995 Feb 15;154(4):1810-6.
100. Sanford JE, Lupan DM, Schlageter AM, Kozel TR. Passive immunization against *Cryptococcus neoformans* with an isotype-switch family of monoclonal antibodies reactive with cryptococcal polysaccharide. *Infect Immun*. 1990 Jun;58(6):1919-23.
101. Rosas AL, Nosanchuk JD, Casadevall A. Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*. 2001 May;69(5):3410-2.
102. Han Y, Cutler JE. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect Immun*. 1995 Jul;63(7):2714-9.
103. Han Y, Riesselman MH, Cutler JE. Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody. *Infect Immun*. 2000 Mar;68(3):1649-54.
104. Han Y, Kanbe T, Cherniak R, Cutler JE. Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. *Infect Immun*. 1997 Oct;65(10):4100-7.
105. Monari C, Kozel TR, Casadevall A, Pietrella D, Palazzetti B, Vecchiarelli A. B7 costimulatory ligand regulates development of the T-cell response to *Cryptococcus neoformans*. *Immunology*. 1999 Sep;98(1):27-35.
106. Vecchiarelli A, Casadevall A. Antibody-mediated effects against *Cryptococcus neoformans*: evidence for interdependency and collaboration between humoral and cellular immunity. *Res Immunol*. 1998 May-Jun;149(4-5):321-33; discussion 500-3.
107. Vecchiarelli A, Monari C, Retini C, Pietrella D, Palazzetti B, Pitzurra L, et al. *Cryptococcus neoformans* differently regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human monocytes. *Eur J Immunol*. 1998 Jan;28(1):114-21.
108. Feldmesser M, Mednick A, Casadevall A. Antibody-mediated protection in murine *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotrophic effects on cytokine and leukocyte responses. *Infect Immun*. 2002 Mar;70(3):1571-80.
109. Han Y, Kozel TR, Zhang MX, MacGill RS, Carroll MC, Cutler JE. Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against

experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *J Immunol.* 2001 Aug 1;167(3):1550-7.

110. Restrepo A, Benard G, de Castro CC, Agudelo CA, Tobon AM. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2008 Apr;29(2):182-97.

111. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia.* 1985 Oct;23(5):323-34.

112. Martinez R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010 Jul-Aug;43(4):480.

113. Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 May;104(3):513-21.

114. Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2004 Feb;28(1):101-12.

115. Miyata S, Casey M, Frank DW, Ausubel FM, Drenkard E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun.* 2003 May;71(5):2404-13.

116. Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26;99(24):15675-80.

117. Mylonakis E, Ausubel FM, Tang RJ, Calderwood SB. The art of serendipity: killing of *Caenorhabditis elegans* by human pathogens as a model of bacterial and fungal pathogenesis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2003 Jun;1(1):167-73.

118. London R, Orozco BS, Mylonakis E. The pursuit of cryptococcal pathogenesis: heterologous hosts and the study of cryptococcal host-pathogen interactions. *FEMS Yeast Res.* 2006 Jun;6(4):567-73.

119. Tang RJ, Breger J, Idnurm A, Gerik KJ, Lodge JK, Heitman J, et al. *Cryptococcus neoformans* gene involved in mammalian pathogenesis identified by a *Caenorhabditis elegans* progeny-based approach. *Infect Immun.* 2005 Dec;73(12):8219-25.

120. Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Aug;9(4):346-51.

121. Tournu H, Serneels J, Van Dijck P. Fungal pathogens research: novel and improved molecular approaches for the discovery of antifungal drug targets. *Curr Drug Targets.* 2005 Dec;6(8):909-22.

122. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Fruit flies as a minihost model for studying drug activity and virulence in *Aspergillus*. *Med Mycol.* 2005 May;43 Suppl 1:S111-4.

123. Reeves EP, Messina CG, Doyle S, Kavanagh K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia*. 2004 Jul;158(1):73-9.
124. Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun*. 2005 Jul;73(7):3842-50.
125. Mylonakis E. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia*. 2008 Jan;165(1):1-3.
126. Dunphy GB, Oberholzer U, Whiteway M, Zakarian RJ, Boomer I. Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae). *Can J Microbiol*. 2003 Aug;49(8):514-24.
127. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002 Oct 11;34(2):153-7.
128. Renwick J, Daly P, Reeves EP, Kavanagh K. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. *Mycopathologia*. 2006 Jun;161(6):377-84.
129. Cytrynska M, Mak P, Zdybicka-Barabas A, Suder P, Jakubowicz T. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides*. 2007 Mar;28(3):533-46.
130. Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol*. 1999 Jun-Jul;23(4-5):329-44.
131. Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol*. 2002 Oct;32(10):1295-309.
132. Russo J, Brehelin M, Carton Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J Insect Physiol*. 2001 Feb 1;47(2):167-72.
133. Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol*. 2000 Jul;182(13):3843-5.
134. Seed KD, Dennis JJ. Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* complex. *Infect Immun*. 2008 Mar;76(3):1267-75.
135. Senior NJ, Bagnall MC, Champion OL, Reynolds SE, La Ragione RM, Woodward MJ, et al. *Galleria mellonella* as an infection model for *Campylobacter jejuni* virulence. *J Med Microbiol*. 2011 May;60(Pt 5):661-9.

136. Mukherjee K, Altincicek B, Hain T, Domann E, Vilcinskis A, Chakraborty T. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Jan;76(1):310-7.
137. Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes Infect.* 2010 Jun;12(6):488-96.
138. Mowlds P, Coates C, Renwick J, Kavanagh K. Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following beta-glucan inoculation. *Microbes Infect.* 2010 Feb;12(2):146-53.
139. Achterman RR, Smith AR, Oliver BG, White TC. Sequenced dermatophyte strains: growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. *Fungal Genet Biol.* 2011 Mar;48(3):335-41.
140. St Leger RJ, Screen SE, Shams-Pirzadeh B. Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Jan;66(1):320-4.
141. Garcia-Rodas R, Casadevall A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PLoS One.* 2011;6(9):e24485.
142. Shokri H, Asadi F, Khosravi AR. Isolation of beta-glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Prod Res.* 2008 Mar 20;22(5):414-21.
143. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
144. Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature.* 1951 Jul 28;168(4265):167.
145. Frases S, Viana NB, Casadevall A. Biophysical methods for the study of microbial surfaces. *Front Microbiol.* 2011;2:207.
146. Nosanchuk JD, Casadevall A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. *Infect Immun.* 1997 May;65(5):1836-41.
147. Cordero RJ, Pontes B, Guimaraes AJ, Martinez LR, Rivera J, Fries BC, et al. Chronological aging is associated with biophysical and chemical changes in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2011 Dec;79(12):4990-5000.
148. Restrepo A, Jimenez BE. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol.* 1980 Aug;12(2):279-81.

149. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957 May;226(1):497-509.
150. da Silva AF, Rodrigues ML, Farias SE, Almeida IC, Pinto MR, Barreto-Bergter E. Glucosylceramides in *Colletotrichum gloeosporioides* are involved in the differentiation of conidia into mycelial cells. *FEBS Lett*. 2004 Mar 12;561(1-3):137-43.
151. Chow SK, Casadevall A. Evaluation of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan-protein conjugate as vaccine candidate against murine cryptococcosis. *Vaccine*. 2011 Feb 24;29(10):1891-8.
152. Dubel S, editor. *Handbook of Therapeutic Antibodies*. Braunschweig: Deutsche National bibliothek; 2007.
153. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
154. de StGroth SF, Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods*. 1980;35(1-2):1-21.
155. Castaneda E, Brummer E, Perlman AM, McEwen JG, Stevens DA. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. *J Med Vet Mycol*. 1988;26(6):351-8.
156. Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*. 2010 Nov-Dec;1(6):475-82.
157. Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, De Bernardis F, Palma AS, Liu Y, et al. Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS One*. 2009;4(4):e5392.
158. Sandini S, La Valle R, Deaglio S, Malavasi F, Cassone A, De Bernardis F. A highly immunogenic recombinant and truncated protein of the secreted aspartic proteases family (rSap2t) of *Candida albicans* as a mucosal anticandidal vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 Jul;62(2):215-24.
159. Viudes A, Lazzell A, Perea S, Kirkpatrick WR, Peman J, Patterson TF, et al. The C-terminal antibody binding domain of *Candida albicans* mp58 represents a protective epitope during candidiasis. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Mar 19;232(2):133-8.
160. Matthews RC, Burnie JP, Howat D, Rowland T, Walton F. Autoantibody to heat-shock protein 90 can mediate protection against systemic candidosis. *Immunology*. 1991 Sep;74(1):20-4.



161. Brena S, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Cabezas J, Moragues MD, Ponton J. Fungicidal monoclonal antibody C7 binds to *Candida albicans* Als3. *Infect Immun*. 2007 Jul;75(7):3680-2.
162. Nascimento RC, Espindola NM, Castro RA, Teixeira PA, Loureiro y Penha CV, Lopes-Bezerra LM, et al. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. *Eur J Immunol*. 2008 Nov;38(11):3080-9.
163. Guimaraes AJ, Frases S, Gomez FJ, Zancope-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 2009 Apr;77(4):1357-67.
164. Nosanchuk JD, Steenbergen JN, Shi L, Deepe Jr GS, Casadevall A. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest*. 2003 Oct;112(8):1164-75.
165. Lopes LC, Guimaraes AJ, de Cerqueira MD, Gomez BL, Nosanchuk JD. A *Histoplasma capsulatum*-specific IgG1 isotype monoclonal antibody, H1C, to a 70-kilodalton cell surface protein is not protective in murine histoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Jul;17(7):1155-8.
166. Rivera J, Mukherjee J, Weiss LM, Casadevall A. Antibody efficacy in murine pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection: a role for nitric oxide. *J Immunol*. 2002 Apr 1;168(7):3419-27.
167. Toledo MS, Suzuki E, Levery SB, Straus AH, Takahashi HK. Characterization of monoclonal antibody MEST-2 specific to glucosylceramide of fungi and plants. *Glycobiology*. 2001 Feb;11(2):105-12.
168. Toledo MS, Tagliari L, Suzuki E, Silva CM, Straus AH, Takahashi HK. Effect of anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies in pathogenic fungal growth and differentiation. Characterization of monoclonal antibody MEST-3 directed to Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2IPC. *BMC Microbiol*. 2010;10:47.
169. Vallejo MC, Matsuo AL, Ganiko L, Medeiros LC, Miranda K, Silva LS, et al. The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic alpha-Galactosyl epitopes. *Eukaryot Cell*. 2011 Mar;10(3):343-51.
170. Calich VL, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol*. 1985 Oct;66(5):585-94.
171. Popi AF, Godoy LC, Xander P, Lopes JD, Mariano M. B-1 cells facilitate *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice via IL-10 secretion. *Microbes Infect*. 2008 Jun;10(7):817-24.
172. Arruda C, Valente-Ferreira RC, Pina A, Kashino SS, Fazioli RA, Vaz CA, et al. Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous

IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. *Infect Immun.* 2004 Jul;72(7):3932-40.

173. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J Immunol.* 1988 Apr 15;140(8):2786-9.

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

175. Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peracoli MT, Soares AM. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent mechanism. *Med Mycol.* 2006 Jun;44(4):363-8.

176. Rea IM, McNerlan SE, Alexander HD. Total serum IL-12 and IL-12p40, but not IL-12p70, are increased in the serum of older subjects; relationship to CD3(+) and NK subsets. *Cytokine.* 2000 Feb;12(2):156-9.

177. Macchia G, Massone A, Burroni D, Covacci A, Censini S, Rappuoli R. The Hsp60 protein of *Helicobacter pylori*: structure and immune response in patients with gastroduodenal diseases. *Mol Microbiol.* 1993 Aug;9(3):645-52.

178. De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock.* 1999 Jan;11(1):1-12.

179. Long KH, Gomez FJ, Morris RE, Newman SL. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *J Immunol.* 2003 Jan 1;170(1):487-94.

180. Izacc SM, Gomez FJ, Jesuino RS, Fonseca CA, Felipe MS, Deepe GS, et al. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2001 Oct;39(5):445-55.

181. Rittner GM, Munoz JE, Marques AF, Nosanchuk JD, Tabora CP, Travassos LR. Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2):e1519.

182. Marques AF, da Silva MB, Juliano MA, Munhoz JE, Travassos LR, Tabora CP. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 2008 Oct;10(12-13):1251-8.

183. Braga CJ, Rittner GM, Munoz Henao JE, Teixeira AF, Massis LM, Sbrogio-Almeida ME, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FliC flagellin. *Infect Immun.* 2009 Apr;77(4):1700-7.

184. Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun*. 1999 Aug;67(8):3703-13.
185. Casadevall A. Passive antibody administration (immediate immunity) as a specific defense against biological weapons. *Emerg Infect Dis*. 2002 Aug;8(8):833-41.
186. Tabora CP, da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia*. 2008 Apr-May;165(4-5):331-9.
187. Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentin E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res*. 2006 Jan;6(1):14-29.
188. Pinto MR, de Sa AC, Limongi CL, Rozental S, Santos AL, Barreto-Bergter E. Involvement of peptidorhamnomannan in the interaction of *Pseudallescheria boydii* and HEp2 cells. *Microbes Infect*. 2004 Nov;6(14):1259-67.
189. Fife T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, et al. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol*. 2004 Sep 1;173(5):3148-54.
190. Sun HX, Xie Y, Ye YP. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*. 2009 Mar 13;27(12):1787-96.
191. Ratcliffe NA. Invertebrate immunity--a primer for the non-specialist. *Immunol Lett*. 1985;10(5):253-70.
192. Bidla G, Hauling T, Dushay MS, Theopold U. Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. *J Innate Immun*. 2009;1(4):301-8.
193. Thomaz L. Proteção ou exacerbação de anticorpos monoclonais gerados contra antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* na infecção experimental. [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

## APÊNDICE

Manuscrito submetido a periódico intitulado: Use of *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*

1 Use of *Galleria mellonella* as a model host to study  
2 *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*

3 Luciana Thomaz<sup>1†</sup>, Rocío García-Rodas<sup>2</sup>, Allan J. Guimarães<sup>3,\*</sup>, Carlos P. Taborda<sup>1</sup>, Oscar Zaragoza<sup>2</sup>,  
4 Joshua D. Nosanchuk<sup>3</sup>

5 <sup>1</sup>Institute of Biomedical Science, Department of Microbiology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>2</sup> Mycology  
6 Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Departments of  
7 Medicine and Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA; \*current address:  
8 Institute of Microbiology Professor Paulo de Goes, Department of Immunology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio  
9 de Janeiro, Brazil.

10

11 **Key words:** *Galleria mellonella*, *Paracoccidioides lutzii*, *Histoplasma capsulatum*, infection model, fungal  
12 pathogenesis

13 <sup>†</sup>Correspondence to: Luciana Thomaz; email lucithomaz@usp.br

14

15 **Abstract:** Non-mammalian models have been used to investigate fungal virulence. In this work we have  
16 explored the use of *Galleria mellonella* as an infection model for the pathogenic dimorphic fungi  
17 *Histoplasma capsulatum* and *Paracoccidioides lutzii*. In mammalian models these fungi cause similar  
18 infections, and disease outcomes are influenced by the quantity of the infective inocula. We describe a  
19 similar aspect in a *G. mellonella* model and characterize the pathogenesis features in this system.  
20 Infection with *P. lutzii* or *H. capsulatum*, in all inoculum used, killed larvae at 25 and 37°C. However, there  
21 was a lack of correlation between the number of yeast cells used for infection and the time to larvae death,  
22 which may indicate that the fungi induce protective responses in a dynamic manner as the lowest  
23 concentrations of fungi induced the most rapid death. For both fungi, the degree of larvae melanization  
24 was directly proportional to the inocula size, and this effect was visibly more apparent at 37°C. Histological  
25 evaluation of the larvae showed a correlation between the inoculum and granuloma-like formation. Our  
26 results suggest that *G. mellonella* is a potentially useful model to study virulence of dimorphic fungi.

27

28

### Introduction

29 Invertebrates have increasingly been viewed as a valid model for studying the virulence of human  
30 pathogens because of the similarities in the basic innate immune systems between these non-vertebrate  
31 hosts and mammals.<sup>1-3</sup> Furthermore, microbial virulence mechanisms, especially of environmental  
32 opportunistic pathogens, are likely conserved among different pathogens as these microbes often have  
33 evolved and maintained their virulence through interactions with a diverse range of environmental

34 predators such as amoeba or nematodes.<sup>4-6</sup> However, some fungi are found free-living in soil and do not  
35 require host for replication and survival, and it has been proposed that their virulence factors required for  
36 mammalian infection emerged as a result of selection in the soil by interactions with environmental  
37 competitors.<sup>7</sup> Popular non-vertebrate hosts for virulence studies of human pathogenic fungi include the  
38 nematode *Caenorhabditis elegans*<sup>8-11</sup>, the fruit fly *Drosophila melanogaster*<sup>12-14</sup>, and the greater wax moth  
39 *Galleria mellonella*.<sup>15-18</sup>

40 Larvae of *G. mellonella* are inexpensive to keep, easy to manipulate and their use may reduce the need  
41 for pathogenicity testing in mammals, with a concomitant reduction in potential mammalian suffering.<sup>15, 19</sup>

42 The immune response of insects such as *G. mellonella* is similar to that of mammals, which consists of  
43 structural and passive barriers, and generates cellular responses via haemocytes within the haemolymph.  
44 Antimicrobial peptides play a crucial role in fighting against pathogens in insects because they lack  
45 adaptative immune system.<sup>20</sup>

46 The greater wax moth has previously been used to examine traits associated with the pathogenicity of  
47 diverse bacterial species, including wild-type and lipopolysaccharide deficient mutants of *Pseudomonas*  
48 *aeruginosa*<sup>21</sup> as well as strains of *Proteus mirabilis*<sup>22</sup>, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*.<sup>21, 23</sup> Moreover,  
49 *G. mellonella* is an effective host model to study fungal pathogenesis. For example, *G. mellonella* has  
50 been used to investigate the role of filamentation<sup>24</sup> and beta-glucans<sup>25</sup> in *Candida albicans*. This is  
51 especially important as *C. albicans* virulence in *G. mellonella* has been shown to correlated with disease in  
52 mice.<sup>18</sup> *G. mellonella* has also been used to study the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*<sup>16</sup>,  
53 *Microsporium gypseum* and *Trichophyton rubrum*<sup>26</sup>, *Aspergillus flavus*<sup>27</sup> and *A. fumigatus*.<sup>15</sup> Moreover, *C.*  
54 *neoformans* morphological changes during infection in mice correlate with those found in *G. mellonella*;  
55 hence, *G. melonella* is considered a valid alternative model host for the study of *C. neoformans* virulence  
56 and pathogenicity.<sup>28</sup>

57 Endemic deep or systemic mycoses are common in specific geographical areas of the world.  
58 Paracoccidioidomycosis (PCM) and histoplasmosis are prevailing examples in tropical regions.  
59 *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* (formerly *P. brasiliensis* isolate 01 and recently  
60 designated as a separate species based on phylogenetic differences<sup>29</sup>) are thermally dimorphic fungi that  
61 cause PCM, the most prevalent systemic mycosis in several countries of Latin America, including Brazil,  
62 Argentina, Venezuela and Colombia. PCM represents the major cause of disability and death among  
63 young adult rural workers during their most productive stage of life. PCM is the tenth most prevalent fatal  
64 chronic infectious diseases in Brazil, and is the systemic mycosis with highest mortality rate in Brazil.<sup>30</sup> In  
65 fact, a survey of records from 1996 – 2006 shows that paracoccidioidomycosis was the main cause of  
66 death among systemic mycoses in Brazil, followed by cryptococcosis, candidiasis and histoplasmosis<sup>31</sup>

67 Histoplasmosis is caused by the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. Although it is highly endemic

68 in tropical climate zones in Central America, South America and in the Ohio and Mississippi River valleys  
69 in the USA, histoplasmosis is a global problem with more than 60 countries reporting the disease.  
70 Histoplasmosis is the most prevalent cause of fungal respiratory infections in the USA, with an estimated  
71 500,000 individuals acquiring the fungus annually. A national survey of hospital discharge diagnoses from  
72 2002 identified 3,370 patients hospitalized for histoplasmosis in the USA with a crude mortality rate of  
73 8%.<sup>32</sup>

74 In the present study, we have investigated the capacity of *G. mellonella* to serve as a model host to assess  
75 the virulence of *P. lutzii* and *H. capsulatum* at environmental (25°C) and physiological (37°C)  
76 temperatures. We evaluated the survival of the larvae when infected with different inocula and we verified  
77 the presence of granulomas in the tissue of the larvae by histopathology. Our results demonstrate that  
78 these fungal pathogens can cause significant disease in *G. mellonella*. Our findings indicate that *G.*  
79 *mellonella* can be used as a host model to study virulence of dimorphic fungal pathogens.

80

81

## Results

82 *Survival of G. mellonella after infection with P. lutzii and H. capsulatum.* The dimorphic fungi, *P. lutzii* strain  
83 Pb01 and *H. capsulatum* strain G184ARAR, killed *G. mellonella* larvae at 25 and 37°C. However, there  
84 was a lack of correlation between the inocula size and the time to death. Each concentration of *P. lutzii*  
85 and of *H. capsulatum* G184ARAR tested significantly reduced the survival of *G. mellonella* compared to  
86 sham or PBS infected larvae (Figure 1 and 2).

87 For *P. lutzii* at 25°C, all inocula were lethal ( $P \leq 0.001$  compared to PBS and sham) with median survival  
88 of 4 days (figure 1A). Interestingly, infection with  $10^1$  or  $10^2$  *P. lutzii* resulted in the most rapid death, as all  
89 larvae expired by day 10 whereas the other infected groups were all dead by day 17-19. In fact, the  
90 difference between the groups receiving the two lowest doses and the groups treated with  $10^3$  and  $10^4$  was  
91 statistically significant ( $P = 0.0056$ ) whereas the differences did not reach statistical differences when  
92 compared to the highest challenge groups. Although not significant, there was also a trend toward an  
93 increased rate of death in the higher inocula groups ( $10^5$  and  $10^6$ ) relative to the middle concentrations  
94 ( $10^3$  and  $10^4$ ).

95 Cultivation of the larvae at 37°C did not enhanced the lethality of  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$  or  $10^6$  cells of *P. lutzii*  
96 per larvae relative to 25°C ( $P > 0.05$ ). However the inoculum of  $10^4$  at 37°C (Figure 2B) was more lethal  
97 than at 25°C ( $P = 0.041$ ). As at 25°C, the most rapid rate of death occurred in the lowest inocula groups.  
98 Nevertheless, the median survival time in aggregate for the infected larvae at both 25°C and 37°C was 4  
99 days.

100 Similar to the infections with *P. lutzii* at 25°C, all concentrations of *H. capsulatum* G184AR killed the larvae  
101 more rapidly relative to controls ( $P \leq 0.001$  compared to PBS and Sham) with a median survival of 7 days

102 (Figure 2A). The most rapid lethality occurred with  $10^1$  and  $10^2$  *H. capsulatum* and these inocula were  
103 significantly more virulent than the other challenge doses ( $P \leq 0.0001$ ). There was again a trend for the  
104 highest challenges ( $10^5$  and  $10^6$ ) to be the second most lethal. At 37°C, there were fewer differences  
105 between the infection groups (Figure 2B). The lower inocula groups died more slowly at 37°C compared to  
106 25°C ( $P < 0.05$ ). The higher temperature was significantly more lethal in the inoculum of  $10^3$  ( $P = 0.0014$ )  
107 when compared to incubation at 25°C.

108 To examine whether lethality was similar across strains, we also tested survival of *G. mellonella* with *H.*  
109 *capsulatum* ATCC G217B (Figure 3). Interestingly, G217B was less virulent than G184AR in our model  
110 system. At 25°C, there were no differences between any of the infected groups relative to controls ( $P >$   
111 0.05). Survival was significantly reduced for each inocula incubated at 37°C compared to the same  
112 challenged dose at 25°C ( $P < 0.001$ ). The median survival time for the infected larvae at 37°C was 11 days  
113 and the infected groups were significantly different from insects that received PBS ( $P < 0.05$ ).

114 *Assessment of melanization of G. mellonella in response to infection.* Since melanization is a key step in  
115 the antimicrobial response of *G. mellonella*, we assessed the pigmentation of the larvae after fungal  
116 challenge. Infected larvae from all groups developed varying degrees of melanization, whereas the control  
117 (PBS and sham) larvae did not. Melanization in the infected larvae was induced within hours of challenge  
118 after infection with either *P. lutzii* or *H. capsulatum*. Responses of *G. mellonella* to *H. capsulatum* yeast  
119 cells at 6 h after infection at 25°C and 37°C are shown in Figures 4 and 5, respectively. The melanization  
120 was more pronounced at 37°C. At both temperatures, the intensity of pigment formation correlated with the  
121 number of inoculated yeast cells. Similar results occurred after infection with *P. lutzii* (data not shown).

122 *G. mellonella histopathological evaluation.* To further understand the fate of *P. lutzii* inoculated into *G.*  
123 *mellonella*, infected larvae were fixed in formalin and processed for histopathology. Figures 6 and 7 show  
124 PAS-stained sections of uninfected and infected larvae incubated at 25°C and 37°C. *P. lutzii* induced  
125 histopathological changes in *G. mellonella*, and yeast cells were observed in sections from infected larvae.  
126 There was evidence of tissue integrity damage in the infected larvae and pigmented nodules and  
127 granulomas were associated with yeast cells. Microscopically, we observed increased melanization in the  
128 nodules with yeast cells at 25°C (Figure 6) compared to those at 37°C (Figure 7). The presence of  
129 granulomas-like containing yeast in the tissue of the larva was also confirmed by counting the nodules  
130 using Image-Pro-Plus, at 25°C and 37°C (Figure 8). Additionally, the number of granulomas-like paralleled  
131 the inoculum density at both temperatures. More yeast cells were visualized in the insects that received  
132 higher inocula ( $10^5$  and  $10^6$ ) at 25°C relative to 37°C ( $P = 0.0027$ ). In the other inocula, the lower and  
133 intermediate, there was no statistical difference. Although *P. lutzii* can undergo morphogenesis at room  
134 temperature, no hyphae or mycelia structures were detected in infected larvae incubated at 25°C over the



135 3 day incubation point examined. No nodules or granulomas-like were detected in the uninfected control  
136 larvae.

137 *Colony forming units* (CFU). Despite plating onto antibiotic agar, no *P. lutzii* were recovered from the  
138 plates. In all experiments, non-*P. lutzii* molds contaminated all plates after 2 weeks.

### 139 **Discussion**

140 We assessed the virulence of the dimorphic fungus *P. lutzii* and *H. capsulatum* in a *G. mellonella* model  
141 using different inocula at two different temperatures. At 25°C in the laboratory and in their environmental  
142 niches, these fungi exist in mycelium forms, and undergo a morphogenic transition to yeast forms at 37°C,  
143 which is are the characteristic pathological forms in mammalian hosts. Survival analysis of *G. mellonella*  
144 larvae challenged with different inoculums of both yeast showed that *P. lutzii* and *H. capsulatum* G184AR  
145 strain are lethal to the insect. In the first 5-7 days after infection half of the all insects died. However, there  
146 was not a positive correlation between increased densities of the yeast cells used in infection with a more  
147 rapid time to death.

148 Melanization in *G. mellonella* is due to activation of phenoloxidase in the hemolymph.<sup>33</sup> In our experiments,  
149 we detected significant melanization in groups of larvae within 6 hours of infection. The process of  
150 melanization is key to the insect's defense against a wide range of pathogens, such as *Aspergillus* spp.<sup>34</sup>,  
151 *C. albicans*<sup>35</sup>, and *C. neoformans*<sup>10</sup>. The melanization process is intended to encapsulate the invading  
152 pathogen within the pigment. The observation that lower infection inocula were highly lethal is interesting  
153 in light of the greater melanization with the largest inocula, suggesting that the lower inocula were able to  
154 avoid triggering phenoloxidase, which may have contributed to the enhanced lethality of the challenges of  
155 the low numbers of yeast cells. This is consistent with a dynamic response by the insect<sup>36</sup> to the quantity of  
156 these fungal pathogens. However, it is clear that triggering of the melanization response is insufficient to  
157 combat these fungi, especially given the observation that the heavily melanized larva infected with *H.*  
158 *capsulatum* G184AR at 37°C succumbed to infection. Interestingly, a melanin-deficient *A. fumigatus*  
159 mutants that triggered enhanced *G. mellonella* melanization displayed increased virulence in the insect.<sup>34</sup>  
160 Hence, the activation of melanization may be either insufficient to combat infection or even potentiate host  
161 damage, perhaps by blocking cellular processes or increasing the rigidity of the insect.

162 The immune response of the *G. mellonella* may differ when the larvae are incubated at 25°C and 37°C. In  
163 figure 6 and 7 we show differences between the formations of the granulomas-like. Notably, the  
164 histopathologic analyses reveal that *G. mellonella* granulomas-like have similarities with the granulomas  
165 associated with paracoccidioidomycosis infection in mammals<sup>37, 38</sup>. The amount of melanin detected  
166 correlated with the degree of melanization of the insects, which also corresponded to the increased  
167 numbers of yeast cells observed in the insects challenged with the highest density inocula.

168 We compared the virulence of two wild-type strains of *H. capsulatum*. G184AR is RFLP class III, while  
169 G217B is RFLP class II.<sup>39</sup> Interestingly, G184AR was more virulent at both 25°C and 37°C, while G217B  
170 was severely attenuated at 25°C. *G. mellonella* has a pathogen recognition protein that recognizes beta-  
171 glucan.<sup>40</sup> G184AR blocks the interaction of cell surface beta-glucan with mammalian dectin-1 by displaying  
172 an alpha-glucan layer over the beta-glucans.<sup>40</sup> In contrast, G217B lacks alpha-glucans on the fungal cell  
173 surface, which unmask beta-glucans for interaction with *G. mellonella* recognition proteins. Future  
174 studies using wild-type G184AR and yeast cells in which alpha-glucan has either been disrupted or  
175 silenced may provide further information regarding this process.

176 Hyphal transformation of either yeast species over the course infection at 25°C was not visualized. This  
177 was not surprising as transformation of *Paracoccidioides* sp in medium specific for transformation, such as  
178 MMcM, requires several weeks to achieve switching of yeast cells into mycelia growth. Future studies will  
179 investigate whether infection with conidia results in mycelia growth or the transformation to yeast forms at  
180 either temperature. We also tried to isolate viable yeast of *P. lutzii* and *H. capsulatum* after 24, 48 and 72  
181 hours of the infection, using the protocol described in<sup>41</sup>; however, the plates were contaminated despite  
182 harvesting the larvae in a laminar flow hood. Notably, plating of homogenates from control uninfected *G.*  
183 *mellonella* also resulted in similar contaminants, suggesting that these insects have fungi as a component  
184 of their normal flora.<sup>42, 43</sup>

185 Our findings with *H. capsulatum* and *P. lutzii* are consistent with the growing literature on the use of insect  
186 models to study fungal pathogenesis. The dynamic of lethality that we observed with our high, middle and  
187 low doses suggests that dimorphic fungi may be useful in characterizing new information about the  
188 response of *G. mellonella* to pathogenic challenge. The results using two different strains of *H. capsulatum*  
189 indicate that this model may be an effective system for screening isolates for virulence as well as for  
190 assessing changes in virulence after disruption of or interference with fungal processes. In summary, *G.*  
191 *mellonella* is potentially useful model to study and compare virulence of dimorphic fungi. Moreover, these  
192 organisms may serve as a useful platform for further studies to dissect the relative role of melanin in  
193 defense versus injury in this insect species.

#### 194 **Materials and Methods**

195 *Strain and growth conditions.* *H. capsulatum* strain G184ARAR (ATCC 26027) and ATCC G217B (ATCC  
196 26032; virulent strain lacking alpha-glucan on the yeast cell surface) and *P. lutzii* strain Pb01 (from Dr.  
197 George Deepe, Cincinnati, Ohio) yeast cells were grown in Sabouraud broth (BD Difco Bacto, Franklin  
198 Lakes, NJ USA) at 37°C for 3 days. Cells were collected and washed the concentration determined by  
199 counting using a haemocytometer and the viability assessed by 0.4% Trypan Blue exclusion, to increase  
200 reproducibility. *Galleria mellonella* larvae wax-moth in the final instar larval stage (Vanderhorst Wholesale,

201 Inc., St. Marys, Ohio) were selected that were similar in size and were without any external grey markings.  
202 Twenty larvae per group were inoculated by injecting 10 µl containing different inoculums of *H. capsulatum*  
203 or *P. lutzii* ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$ ) diluted in sterile PBS into the haemocoel through the last proleg  
204 as described previously.<sup>44</sup> The inoculations were performed with a Hamilton syringe with a needle  
205 diameter of 0.75 mm. And the needles were cleaned after all injections and between fungal strains. The  
206 same number of caterpillars was inoculated with PBS in each experiment to monitor killing due to physical  
207 injury and another group of caterpillars without any manipulation was followed in parallel as an untreated  
208 (sham) control. All larvae were placed in sterile Petri dishes and maintained in the dark at 25° or 37°C in a  
209 stationary incubator. Mortality was monitored twice daily. Larvae death was assessed by the lack of  
210 movement of larvae in response to stimulation together with discoloration of the cuticle. Different PBS and  
211 untreated controls were used for each experiment at each temperature. Killing curves were plotted and  
212 statistical analyses were performed using the Log-rank (Mantel-Cox) test survival Graph Pad Prism 5 (La  
213 Jolla, CA, USA).

214 *Assessment of Melanization of G. mellonella after infection.* After 6 hours of the infection with different  
215 inocula of *P. lutzii* and *H. capsulatum* G184ARAR, pictures were taken with Olympus camera X-845, to  
216 show the darker areas as a result of the melanization process.

217 *Histopathology.* *P. lutzii* infected and uninfected larvae (three per group) were fixed by immersion in  
218 phosphate buffered 4% formalin after 3 days of infection. The larvae were cut into two symmetric pieces,  
219 and immersed in 70% ethanol. Sections were then embedded in paraffin wax, sectioned and stained with  
220 Periodic acid-Schiff (PAS) for microscopic examination at 10x magnification. The granuloma-like structures  
221 containing yeast were counted using Image Pro Plus 4.0 (1.45 Wayne Rasband NIH, USA).

222 *Determination of fungal burden in G. mellonella.* Four inoculated larvae were homogenized in 4 ml of PBS  
223 and 100 µl aliquots of this solution were plated on Brain Heart Infusion (BHI) agar (BD Difco Bacto,  
224 Franklin Lakes, NJ USA) containing 0.1% and 1% penicillin/streptomycin (Gibco-BRL/Life Technologies,  
225 Rockville, MD USA) to prevent bacterial growth. This experiment was carried out using different inocula of  
226 *P. lutzii* and *H. capsulatum*. The plates were incubated at 37°C.

227 *Statistical analysis.* The data using *P. lutzii* were generated from four independent experiments, whereas  
228 the experiments with *H. capsulatum* G184ARAR (ATCC 26027) were performed three times and *H.*  
229 *capsulatum* ATCC G217B (ATCC 26032) were done on two separate dates. Viability data were analyzed  
230 using the Log-rank (Mantel-Cox) test survival, one way ANOVA, Graph Pad Prism 5 (La Jolla, CA, USA)  
231 and Microsoft Excel.

232

233

#### Acknowledgements

234 LT was supported by a grant from FAPESP No. 2007/53175-1, Brazil. The work was supported in part by an  
235 Interhemispheric Research Training Grant in Infectious Diseases, Fogarty International Center (NIH D43-TW007129)  
236 JDN is supported in part by NIH AI52733. Arturo Casadevall and Monica Garcia provided the larvae.

237

238

#### References

- 239 1. Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity  
240 testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28:101-12.
- 241 2. Bergin D, Reeves EP, Renwick J, Wientjes FB, Kavanagh K. Superoxide production in  
242 *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase  
243 complex of human neutrophils. *Infect Immun* 2005; 73:4161-70.
- 244 3. Brennan CA, Anderson KV. *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and  
245 response. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:457-83.
- 246 4. Swanson MS, Hammer BK. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey  
247 from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54:567-613.
- 248 5. Casadevall A, Steenbergen JN, Nosanchuk JD. 'Ready made' virulence and 'dual use'  
249 virulence factors in pathogenic environmental fungi--the *Cryptococcus neoformans* paradigm.  
250 *Curr Opin Microbiol* 2003; 6:332-7.
- 251 6. Casadevall A. Host as the variable: model hosts approach the immunological  
252 asymptote. *Infect Immun* 2005; 73:3829-32.
- 253 7. Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human  
254 pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect* 2003; 5:667-75.
- 255 8. Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB. Killing of  
256 *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc*  
257 *Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:15675-80.
- 258 9. Mylonakis E, Ausubel FM, Tang RJ, Calderwood SB. The art of serendipity: killing of  
259 *Caenorhabditis elegans* by human pathogens as a model of bacterial and fungal pathogenesis.  
260 *Expert Rev Anti Infect Ther* 2003; 1:167-73.
- 261 10. London R, Orozco BS, Mylonakis E. The pursuit of cryptococcal pathogenesis:  
262 heterologous hosts and the study of cryptococcal host-pathogen interactions. *FEMS Yeast Res*  
263 2006; 6:567-73.
- 264 11. Tang RJ, Breger J, Idnurm A, Gerik KJ, Lodge JK, Heitman J, et al. *Cryptococcus*  
265 *neoformans* gene involved in mammalian pathogenesis identified by a *Caenorhabditis elegans*  
266 progeny-based approach. *Infect Immun* 2005; 73:8219-25.
- 267 12. Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host  
268 defense. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9:346-51.
- 269 13. Tournu H, Serneels J, Van Dijck P. Fungal pathogens research: novel and improved  
270 molecular approaches for the discovery of antifungal drug targets. *Curr Drug Targets* 2005;  
271 6:909-22.
- 272 14. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Fruit flies as a minihost model for studying drug activity  
273 and virulence in *Aspergillus*. *Med Mycol* 2005; 43 Suppl 1:S111-4.
- 274 15. Reeves EP, Messina CG, Doyle S, Kavanagh K. Correlation between gliotoxin production  
275 and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* 2004; 158:73-9.
- 276 16. Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al.  
277 *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect*  
278 *Immun* 2005; 73:3842-50.
- 279 17. Dunphy GB, Oberholzer U, Whiteway M, Zakarian RJ, Boomer I. Virulence of *Candida*  
280 *albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae). *Can J*  
281 *Microbiol* 2003; 49:514-24.

- 282 18. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of  
283 *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med*  
284 *Microbiol* 2002; 34:153-7.
- 285 19. Renwick J, Daly P, Reeves EP, Kavanagh K. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella*  
286 to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination.  
287 *Mycopathologia* 2006; 161:377-84.
- 288 20. Cytrynska M, Mak P, Zdybicka-Barabas A, Suder P, Jakubowicz T. Purification and  
289 characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides*  
290 2007; 28:533-46.
- 291 21. Jarrell KF, Kropinski AM. The virulence of protease and cell surface mutants of  
292 *Pseudomonas aeruginosa* for the larvae of *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol* 1982; 39:395-  
293 400.
- 294 22. Lemaître B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral  
295 regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in  
296 *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86:973-83.
- 297 23. Apidianakis Y, Rahme LG, Heitman J, Ausubel FM, Calderwood SB, Mylonakis E.  
298 Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate  
299 immune response. *Eukaryot Cell* 2004; 3:413-9.
- 300 24. Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation  
301 in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes Infect* 2010; 12:488-96.
- 302 25. Mowlds P, Coates C, Renwick J, Kavanagh K. Dose-dependent cellular and humoral  
303 responses in *Galleria mellonella* larvae following beta-glucan inoculation. *Microbes Infect*  
304 2010; 12:146-53.
- 305 26. Achterman RR, Smith AR, Oliver BG, White TC. Sequenced dermatophyte strains:  
306 growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. *Fungal*  
307 *Genet Biol* 2011; 48:335-41.
- 308 27. St Leger RJ, Screen SE, Shams-Pirzadeh B. Lack of host specialization in *Aspergillus*  
309 *flavus*. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:320-4.
- 310 28. Garcia-Rodas R, Casadevall A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O.  
311 *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria*  
312 *mellonella* infection. *PLoS One* 2011; 6:e24485.
- 313 29. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al.  
314 Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol*  
315 *Phylogenet Evol* 2009; 52:273-83.
- 316 30. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, et al.  
317 *Paracoccidioidomycosis* mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* 2002; 18:1441-54.
- 318 31. Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic  
319 mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996  
320 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:513-21.
- 321 32. Chu JH, Feudtner C, Heydon K, Walsh TJ, Zaoutis TE. Hospitalizations for endemic  
322 mycoses: a population-based national study. *Clin Infect Dis* 2006; 42:822-5.
- 323 33. Ratcliffe NA. Invertebrate immunity--a primer for the non-specialist. *Immunol Lett*  
324 1985; 10:253-70.
- 325 34. Jackson JC, Higgins LA, Lin X. Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are  
326 highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*. *PLoS One* 2009; 4:e4224.
- 327 35. Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the *in vivo*  
328 pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 27:163-9.
- 329 36. Bidla G, Hauling T, Dushay MS, Theopold U. Activation of insect phenoloxidase after  
330 injury: endogenous versus foreign elicitors. *J Innate Immun* 2009; 1:301-8.
- 331 37. Thomaz L, Apitz-Castro R, Marques AF, Travassos LR, Taborda CP. Experimental  
332 *paracoccidioidomycosis*: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*,  
333 associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. *Med Mycol* 2008; 46:113-8.

- 334 38. Buissa-Filho R, Puccia R, Marques AF, Pinto FA, Munoz JE, Nosanchuk JD, et al. The  
 335 monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*  
 336 mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the  
 337 fungus. *Infect Immun* 2008; 76:3321-8.
- 338 39. Spitzer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. Use of mitochondrial and  
 339 ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*.  
 340 *Infect Immun* 1989; 57:1409-12.
- 341 40. Kim CH, Shin YP, Noh MY, Jo YH, Han YS, Seong YS, et al. An insect multiligand  
 342 recognition protein functions as an opsonin for the phagocytosis of microorganisms. *J Biol*  
 343 *Chem* 2010; 285:25243-50.
- 344 41. Castaneda E, Brummer E, Perlman AM, McEwen JG, Stevens DA. A culture medium for  
 345 *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. *J Med*  
 346 *Vet Mycol* 1988; 26:351-8.
- 347 42. Jarosz J. Gut flora of *Galleria mellonella* suppressing ingested bacteria. *J Invertebr*  
 348 *Pathol* 1979; 34:192-8.
- 349 43. Williams GEBaR. The microbial flora of laboratory cultures of the greater wax moth and  
 350 its effect rearing parasites. *Journal of Invertebrate Pathology* 1967; 9:467-73.
- 351 44. Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a  
 352 model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 2010; 1:475-82.

353

354

355

#### Legend of figures

356 Figure 1. Log-Rank plots of the survival of *G. mellonella* after infection with different concentrations of *P. lutzii* yeast  
 357 cells. *G. mellonella* infected and incubated at (A) 25°C or (B) 37°C. Controls included uninfected larva (Sham) and larva  
 358 injected with PBS. n= 80 larvae per group.

359 Figure 2. Log-Rank plots of the survival of *G. mellonella* after infection with different concentrations of *H. capsulatum*  
 360 G184AR yeast cells. *G. mellonella* infected and incubated at (A) 25°C or (B) 37°C. Controls included uninfected larva  
 361 (Sham) and larva injected with PBS. n= 60 larvae per group.

362 Figure 3. Log-Rank plots of the survival of *G. mellonella* after infection with different concentrations of *H. capsulatum*  
 363 ATCC G217B yeast cells. *G. mellonella* infected and incubated at (A) 25°C or (B) 37°C. Controls included uninfected  
 364 larva (Sham) and larva injected with PBS. n= 32 larvae per group.

365 Figure 4. Infection of *G. mellonella* with *H. capsulatum* G184AR yeast cells induces melanization of the larva in a dose  
 366 dependent manner. Larvae were injected with (A) PBS, (B) 10<sup>1</sup>, (C) 10<sup>2</sup>, (D) 10<sup>3</sup>, (E) 10<sup>4</sup>, (F) 10<sup>5</sup>, or (G) 10<sup>6</sup> colonies of  
 367 *H. capsulatum*/larvae. The images were taken 6 h after infection at 25°C.

368 Figure 5. Infection of *G. mellonella* with *H. capsulatum* G184AR yeast cells induces melanization of the larva in a dose  
 369 dependent manner. Larvae were injected with (A) PBS, (B) 10<sup>1</sup>, (C) 10<sup>2</sup>, (D) 10<sup>3</sup>, (E) 10<sup>4</sup>, (F) 10<sup>5</sup>, or (G) 10<sup>6</sup> colonies of  
 370 *H. capsulatum*/larvae. The images were taken 6 h after infection at 37°C.

371 Figure 6. PAS-stained sections of *G. mellonella*. (A) Uninfected control larva inoculated with 0.1 M PBS. Larva infected  
 372 with *P. lutzii* at concentrations of (B) 10<sup>1</sup>, (C) 10<sup>2</sup>, (D) 10<sup>3</sup>, (E) 10<sup>4</sup> and (F) 10<sup>5</sup> colony forming units. All larva were  
 373 incubated at 25°C. Structures are annotated as follows: a, adipose bodies; b, fungal cells; c, cuticle; h, haemolymph.