



**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Dermatologia**

Triagem e caracterização de antígenos de *Paracoccidioides spp.* e *Histoplasma capsulatum* para o desenvolvimento de ferramenta terapêutica baseada em anticorpos monoclonais e quiméricos

Ágata Nogueira D'Áurea Moura

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2021**

Ágata Nogueira D'Áurea Moura

Triagem e caracterização de antígenos de *Paracoccidioides spp.* e *Histoplasma capsulatum* para o desenvolvimento de ferramenta terapêutica baseada em anticorpos monoclonais e quiméricos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção título
de Doutora em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moura, Ágata Nogueira D'Áurea
Triagem e caracterização de antígenos de
Paracoccidioides spp. e Histoplasma capsulatum para
o desenvolvimento de ferramenta terapêutica baseada
em anticorpos monoclonais e quiméricos / Ágata
Nogueira D'Áurea Moura. -- São Paulo, 2021.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: Carlos Pelleschi Taborda.

Descritores: 1.Paracoccidioidomicose
2.Paracoccidioides 3.Histoplasmose 4.Histoplasma
5.Proteômica 6.Engenharia genética 7.Chaperonina 60
8.Quimera 9.Imunoterapia 10.Edição de genes

USP/FM/DBD-129/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DATA DA DEFESA E APROVAÇÃO DO DOUTORADO

03 de maio de 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Gil Benard

Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

Universidade de São Paulo

Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Gilda Maria Del Negro

Universidade de São Paulo

Prof. Dra. Karen Spadari Ferreira

Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Adriana Pardini

Instituto Adolf Lutz

DEDICATÓRIA

À minha mãe Sônia, à minha madrinha Sandra e aos meus tios José Márcio e Giselda, por todo amor, cumplicidade, respeito, e suporte.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda, pela oportunidade e orientação, sem o qual não seria possível a concretização desse trabalho. Muito obrigada pelos 4 anos de parceria e confiança, que foram essenciais para o meu desenvolvimento.

Meus agradecimentos ao Prof. Dr. Joshua Daniel Nosanchuk por ter aberto as portas de seu laboratório para a realização de parte do meu doutorado, e pela contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Profa Dra Leila Maria Lopes Bezerra pela orientação teórica e suporte técnico no desempenho de experimentos.

Ao Prof. Dr Gil Benard e à Profa Dra Gilda Maria Barbaro Del Negro pelos ensinamentos e pela contribuição no fornecimento de insumos para a realização de alguns experimentos.

Ao Dr. Steven C. Almo, Dr. Jonathan R. Lai, e ao Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira pela colaboração e por permitirem a realização de experimentos em seus respectivos laboratórios. Por conseguinte, meu muito obrigada aos colegas Darien, Lennon Ramos Pereira, Natiely Silva Sales, e Nayara Santos, que participaram da realização desses experimentos em colaboração.

Ao colaborador Scott J. Garforth e à amiga Ana Camila Oliveira de Souza por dicas valiosas para o planejamento de ensaios importantes.

Ao Dr. Ernesto Nakayasu, pelo desenvolvimento de análise proteômica no Pacific Northwest National Laboratory.

Também gostaria de agradecer às secretarias dos Programas de Pós-Graduação dos Departamentos de Dermatologia - FMUSP e Microbiologia – ICB/USP, pelo apoio educacional.

Agradeço o auxílio da Zita Maria de Oliveira Gregório pelo suporte laboratorial e por todos os anos de convívio.

Por fim, agradeço aos colegas e amigos dos laboratórios de Fungos Dimórficos Patogênicos do ICB/USP e do Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo/LIM53 – Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina/USP pelos anos de convivência e aprendizado.

Work gives you meaning and purpose, and life is empty without it.

Stephen Hawking

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MECANISMOS DE EDIÇÃO DE GENOMA POR CRISPR-Cas9.	38
FIGURA 2. FRACIONAMENTO DE EXTRATOS GLICOPROTEICOS POR SDS-PAGE.	51
FIGURA 3. DETECÇÃO DE GLICOCOMPOSTOS EXTRAÍDOS DE PARACOCCIDIOIDES SPP. POR DOT BLOT.	51
FIGURA 4. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS COM SOROS OBTIDOS DE CAMUNDONGOS COM PCM EXPERIMENTAL POR WESTERN BLOT.	53
FIGURA 5. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS COM SOROS OBTIDOS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM PCM POR WESTERN BLOT.	54
FIGURA 6. RELAÇÃO ENTRE PORCENTAGEM EM MASSA E INTENSIDADE DE PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DE PARACOCCIDIOIDES SPP.	56
FIGURA 7. MAPA DE CALOR BASEADO NOS VALORES DE IBAQ OBTIDOS PELA ANÁLISE DAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS NAS FRAÇÕES DE 15 E 30 KDA EXTRAÍDAS DE LEVEDURAS DE Pb01.	57
FIGURA 8. MAPA DE CALOR BASEADO NOS VALORES DE IBAQ OBTIDOS PELA ANÁLISE DAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS NAS FRAÇÕES DE 15 E 30 KDA EXTRAÍDAS DE LEVEDURAS DE Pb18.	59
FIGURA 9. ESTRUTURA BÁSICA DE UM ANTICORPO QUIMÉRICO.	74
FIGURA 10. OS ANTICORPOS CONSISTEM EM SEGMENTOS CONECTADOS POR PORÇÃO FLEXÍVEL.	75
FIGURA 11. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA HSP60 DE H. CAPSULATUM.	80
FIGURA 12. COMPARAÇÃO ENTRE CLONES 1 E 4 PARA EXPRESSÃO DA HSP60 SOLÚVEL.	81
FIGURA 13. ANÁLISE POR SDS-PAGE DAS FRAÇÕES OBTIDAS COM A PURIFICAÇÃO DE HSP60 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.	82
FIGURA 14. CÉLULAS DE HIBRIDOMA PRODUTORAS DE MAB 4E12 ANALISADAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA.	83
FIGURA 15. ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DOS INICIADORES CONSTRUÍDOS NA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA DA REGIÃO VARIÁVEL DE MAB 4E12.	85
FIGURA 16. PURIFICAÇÃO DAS BANDAS DOS FRAGMENTOS DE DNA DA REGIÃO VARIÁVEL DE MAB 4E12.	86
FIGURA 17. VETORES DE EXPRESSÃO DE IGG QUIMÉRICO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS.	88
FIGURA 18. ANÁLISE E CONFIRMAÇÃO DE CLONAGEM DOS INSERTOS NOS SÍTIOS CORRETOS.	89
FIGURA 19. ELETROFORESE POR SDS-PAGE E NATIVE-PAGE DAS AMOSTRAS DE ANTICORPOS QUIMÉRICOS PURIFICADAS APÓS EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA.	93
FIGURA 20. ELETROFORESE POR SDS-PAGE E NATIVE-PAGE DA AMOSTRA DE ANTICORPO QUIMÉRICO PURIFICADA APÓS EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA.	93
FIGURA 21. MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE PURIFICAÇÃO POR FILTRAÇÃO EM GEL.	94
FIGURA 22. CH-MAB 4E12 RECONHECE A HSP60 NA AMOSTRA CONTENDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE E NOS EXTRATOS PROTEICOS.	95
FIGURA 23. QUIMERA DERIVADA DE MAB 4E12 MOSTROU PERDA DE AFINIDADE PELA HSP60.	96
FIGURA 24. ENSAIO DE FAGOCITOSE.	98

FIGURA 25. DETECÇÃO E CAPTURA DE FAGOCITOSE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE LEVEDURAS DO ISOLADO G217B POR MACRÓFAGOS THP1.....	99
FIGURA 26. DETECÇÃO E CAPTURA DE FAGOCITOSE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE LEVEDURAS DO ISOLADO PB01 POR MACRÓFAGOS THP1.....	100
FIGURA 27. MARCAÇÃO DIFERENCIAL PARA DEMONSTRAÇÃO DO EVENTO DA FAGOCITOSE DE LEVEDURAS DE H. CAPSULATUM, OPSONIZADAS COM ANTICORPO QUIMÉRICO, POR MACRÓFAGOS THP1.....	101
FIGURA 28. MARCAÇÃO DIFERENCIAL PARA DEMONSTRAÇÃO DO EVENTO DA FAGOCITOSE DE LEVEDURAS DE P. LUTZII, OPSONIZADAS COM ANTICORPO QUIMÉRICO, POR MACRÓFAGOS THP1.....	102
FIGURA 29. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR REDUÇÃO DE MTT.....	103
FIGURA 30. CURVA DE KAPLAN-MEIER PARA ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	104
FIGURA 31. NÚMEROS DE UFC NOS (A) PULMÕES E (B) BAÇOS DE CAMUNDONGOS APÓS 7 DIAS DE INFECÇÃO POR H. CAPSULATUM VAR. CAPSULATUM.....	105
FIGURA 32. SELEÇÃO DE SEQUÊNCIA PARA RNA ESPAÇADOR NO GENE HSP60.....	111
FIGURA 33. CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE RNA GUIA HÍBRIDO.....	112
FIGURA 34. AUTOEXCISÃO DO RNA GUIA POR RIBOZIMAS.....	113
FIGURA 35. CLIVAGEM POR CAS9 GUIADA POR RNA.....	114
FIGURA 36. CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE CAS9.....	115
FIGURA 37. VETOR ESQUELETO PARA EXPRESSÃO GÊNICA.....	117
FIGURA 38. NOVA CONSTRUÇÃO PLASMIDIAL PARA SISTEMA CRISPR/CAS9.....	123
FIGURA 39. CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DE A. TUMEFACIENS COM A NOVA CONSTRUÇÃO PLASMIDIAL.....	125
FIGURA 40. CONFIRMAÇÃO DE INSERTOS APÓS TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS TERMOCOMPETENTES COM NOVA CONSTRUÇÃO PLASMIDIAL EXTRAÍDA DE ELETROTRANSFORMANTES LBA4404.....	125
FIGURA 41. CONSTRUÇÃO DE VETOR PLASMIDIAL COM FUNÇÃO DE VACINA DE DNA.....	159
FIGURA 42. LINEARIZAÇÃO DOS VETORES PARA VACINA DE DNA E CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DOS INSERTOS.....	161
FIGURA 43. CONFIRMAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS H2B E CARREADOR DE ADP/ATP POR CÉLULAS HEK 293 TRANSFECTADAS.....	163
FIGURA 44. LINEARIZAÇÃO DO VETOR PET28A PARA CONFIRMAÇÃO DA SUBCLONAGEM DA SEQUÊNCIA PARA PROTEÍNA CARREADORA DE ADP/ATP.....	164

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. INICIADORES COM SEQUÊNCIAS OVERHANG PARA PAREAMENTO COM O VETOR DE EXPRESSÃO PMAZ SEGUIDAS DE SEQUÊNCIAS DE BASES OBTIDAS DO BANCO DE DADOS DE KABAT.	84
TABELA 2. SEQUÊNCIAS COMPREENDENDO FRAGMENTOS DE DNA PARA CADEIA PESADA E REGIÃO CONSTANTE, TRADUZIDAS EM FASE DE LEITURA ABERTA.	90
TABELA 3. SEQUÊNCIAS COMPREENDENDO FRAGMENTOS DE DNA PARA CADEIA LEVE E REGIÃO CONSTANTE, TRADUZIDAS EM FASE DE LEITURA ABERTA.	91
TABELA 4. NÚMERO DE OCORRÊNCIAS ENCONTRADAS PARA O ALINHAMENTO EM REGIÕES DO GENOMA DE ISOLADOS FÚNGICOS COM A SEQUÊNCIA ALVO DE 20 NT SELECIONADA NO GENE HSP60 DE <i>H. CAPSULATUM</i>.	122

LISTA DE ABREVIACOES

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local (Basic Local Alignment Search Tool)
BSA	Albumina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin)
cDNA	DNA complementar (complementary DNA)
CDR	Região Determinante de Complementaridade (Complementarity-determining region)
Cr	Região constante (Constant region)
CRISPR	Sistema de Repetioes Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaadas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
crRNA	RNA de interferência (crispr RNA)
DO	Densidade ptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Dithiothreitol
EDTA	cido Etilenodiamino Tetra-Acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)
FDA Medicamentos	Agência Federal de Administraao de Alimentos e (Food and Drug Administration)
HACA	Anticorpo Humano contra Anticorpo Quimérico (Human Anti-Chimeric Antibody)
HAMA	Anticorpo Humano contra Anticorpo de Camundongo (Human Anti-Mouse Antibody)

HEPES	Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico
Hc	Cadeia pesada (Heavy chain)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus)
HSP	Proteína de Choque Térmico (Heat Shock Protein)
iBAQ	Quantificação Absoluta baseada em Intensidade (Intensity-based Absolute Quantification)
LB	Extremidade esquerda do tDNA (Left-Border)
Lc	Cadeia Leve (Light chain)
MAb	Anticorpo Monoclonal (Monoclonal Antibody)
MS	Espectrometria de Massa (Mass spectrometry)
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (National Center for Biotechnology Information)
NLS	Sinal de Localização Nuclear (Nuclear Location Sign)
PAM	Motivo Adaptador Protospacer (Protospacer Adjacent Motif)
PBS	Solução Tampão Fosfato-Salina (Phosphate Buffered Saline)
PCM	Paracoccidiodomicose
PEI	Polietilenoimina
PTM	Mudança Pós-traducional (Post-translational modification)
RB	Extremidade direita do tDNA (Right-Border)
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio

	(Sodium dodecyl sulfate)
SFB	Soro Fetal Bovino
sgRNA	RNA guia único (single guide RNA)
SMC	Sítio Múltiplo de Clonagem
SNC	Sistema Nervoso Central
tDNA	DNA de transferência (transfer DNA)
TMB	Tetrametilbenzidina
TLC	Cromatografia de Camada Delgada (Thin-Layer Chromatography)
TRACE	CRISPR/Cas9 transitório acoplado com eletroporação (Transient CRISPR/Cas9 coupled with Electroporation)
tracrRNA	RNA transativador (trans-activating crisper RNA)
UFC	Unidades formadoras de colônias
VPA	Ácido Valproico (Valproic acid)
Vr	Região variável (Variable region)

FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Paracoccidioidomicose	22
1.1.1. Epidemiologia	22
1.1.2. Manifestações Clínicas	24
1.1.3. Reservatórios e Transmissão	25
1.1.4. Isolados de interesse	25
1.1.5. Terapia Medicamentosa	26
1.2. Histoplasmose	27
1.2.1. Epidemiologia	27
1.2.2. Manifestações Clínicas	28
1.2.3. Reservatórios e Transmissão	30
1.2.4. Isolados de interesse	31
1.2.5. Terapia Medicamentosa	32
1.3. Terapia baseada em anticorpos	33
1.4. Sistemas de Edição Genética como ferramenta para o desenvolvimento de novas terapias	36
1.5. Antígenos de relevância como alvos terapêuticos	39
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVO GERAL	43
4. CAPÍTULO I: Triagem de alvos terapêuticos extraídos de <i>Paracoccidioides spp.</i>	44
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4.1.1. Extrair compostos de parede celular e exoantígenos de células leveduriformes de isolados de <i>Paracoccidioides spp.</i> ;	44
4.1.2. Realizar triagem por testes de reatividade contra soros policlonais obtidos de camundongos com PCM experimental e de pacientes diagnosticados com PCM;	44
4.1.3. Identificar moléculas de interesse por Espectrometria de Massa a partir de grupos selecionados que apresentarem potencial imunogênico;	44
4.2. METODOLOGIA	44
4.2.1. Isolados	44
4.2.2. Condições de cultivo	45
4.2.3. Preparação do inóculo e Infecção experimental para obtenção de soro policlonal	45
4.2.4. Soros de pacientes diagnosticados com PCM	45
4.2.5. Animais	46
4.2.6. Extração de compostos celulares	46
4.2.7. Análise eletroforética de proteínas e glicopeptídeos	47
4.2.8. Análise de glicolipídeos por TLC	48
4.2.9. Detecção e triagem de antígenos com anticorpos policlonais	48
4.2.10. Análise Proteômica	49

4.3. RESULTADOS	50
4.3.1. Análise do perfil de macromoléculas pela separação e detecção de frações	50
4.3.2. Proteômica como ferramenta na busca por candidatos vacinais em potencial	54
4.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	59
4.5. PERSPECTIVAS FUTURAS	62
5. CAPÍTULO II: Quimerização de Anticorpo Monoclonal contra HSP60 de <i>Histoplasma capsulatum</i>	63
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
5.1.1. Amplificar a Região Variável do Anticorpo Monoclonal contra HSP60 de <i>H. capsulatum</i> a partir de RNA extraído do hibridoma produtor do MAb 4E12;	63
5.1.2. Clonar os insertos de cadeia leve e pesada em vetores contendo sequências para Região Constante de anticorpo IgG humano;	63
5.1.3. Expressar Anticorpo Quimérico anti-HSP60 em células HEK 293 por método de transfecção;	63
5.1.4. Purificar e testar Quimera quanto à afinidade e eficácia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	64
5.2. METODOLOGIA	64
5.2.1. Isolados	64
5.2.2. Condições de cultivo	64
5.2.3. Sistema de Ligação	64
5.2.4. Transformação com construção de DNA recombinante	64
5.2.5. Expressão da HSP60 recombinante de <i>H. capsulatum</i>	65
5.2.6. Purificação da proteína recombinante	66
5.2.7. Extração e Quantificação de Proteínas provenientes de <i>Paracoccidioides</i> spp. e <i>H. capsulatum</i>	66
5.2.8. Análise eletroforética de proteínas	66
5.2.9. Soros de pacientes	67
5.2.10. Descongelamento e manutenção do clone produtor do Anticorpo Monoclonal (MAb) contra HSP60	67
5.2.11. Verificação de estabilidade genética do MAb	67
5.2.12. Extração de RNA de células de hibridoma	69
5.2.13. Construção de iniciadores para amplificação	69
5.2.14. Amplificação de sequências das cadeias variáveis	70
5.2.15. Purificação de fragmento de DNA	70
5.2.16. Preparo de vetor linearizado	70
5.2.17. Clonagem em vetor de expressão	71
5.2.18. Sequenciamento e seleção de clones	71
5.2.19. Transfecção e expressão de anticorpo quimérico	72
5.2.20. Purificação de anticorpo quimérico	72
5.2.21. Engenharia de anticorpos: Esquema para quimera construída por manipulação genética	73
5.2.22. Titulação de ch-MAb 4E12	75
5.2.23. Detecção por Western Blot da proteína HSP60 pelo anticorpo quimérico	75
5.2.24. Ensaio de fagocitose	76
5.2.25. Ensaio de Citotoxicidade	77
5.2.26. Ensaio de toxicidade aguda em larvas de <i>Galleria Mellonella</i>	77
5.2.27. Ensaio para contagem de Unidades Formadoras de Colônias	78

5.2.28.	Análise estatística	78
5.3.	RESULTADOS	78
5.3.1.	Seleção de clones para expressão de HSP60 recombinante solúvel	79
5.3.2.	Obtenção de HSP60 pura por Cromatografia de Afinidade	81
5.3.3.	Estabilidade genética do anticorpo monoclonal 4E12	82
5.3.4.	Quadro de prospecção para triagem de Iniciadores	84
5.3.5.	Seleção de iniciadores senso e anti-senso para amplificação das Regiões Variáveis	84
5.3.6.	Vetores pMAZ e os sítios de inserção para as sequências da região variável do MAb 4E12	86
5.3.7.	Confirmação da localização e do tamanho dos insertos após clonagem no vetor pMAZ	88
5.3.8.	Análises dos resultados de Sequenciamento	89
5.3.9.	Obtenção de anticorpo quimérico contra HSP60 purificado	92
5.3.10.	O anticorpo quimérico manteve a reatividade contra HSP60	94
5.3.11.	Afinidade do anticorpo quimérico comparada a do anticorpo monoclonal correspondente	95
5.3.12.	Anticorpo quimérico contra HSP60 é capaz de aumentar a capacidade fagocítica <i>in vitro</i> das espécies <i>H. capsulatum</i> e <i>P. lutzii</i>	96
5.3.13.	Viabilidade celular de macrófagos incubados com anticorpo quimérico ch-MAb 4E12	103
5.3.14.	Ensaio preliminar de toxicidade aguda em <i>G. mellonella</i>	104
5.3.15.	Carga fúngica pulmonar e esplênica de camundongos após 7 dias de infecção por <i>H. capsulatum</i>	104
5.4.	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	105
5.5.	PERSPECTIVAS FUTURAS	107
6.	CAPÍTULO III: Desenvolvimento de um sistema para interrupção de genes mediada por CRISPR/Cas9 aplicada à <i>Histoplasma capsulatum</i>	108
6.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	108
6.2.1.	Analisar o gene de hsp60 quanto a sequências alvo passíveis de edição gênica utilizando Sistema CRISPR/Cas9;	108
6.2.2.	Selecionar sequências promotoras e terminadoras de transcrição gênica adequadas ao modelo experimental;	108
6.2.3.	Construir Cassetes contendo o RNA quimérico ou a nuclease Cas9;	108
6.2.4.	Escolher um vetor esqueleto para clonagem dos insertos;	108
6.2.5.	Testar o sistema por meio de transferência da região de tDNA do plasmídeo para células de <i>H. capsulatum</i> a partir de transformantes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	109
6.2.	METODOLOGIA	109
6.2.1.	Isolados fúngico e bacteriano	109
6.2.2.	Meios de cultivo	109
6.2.3.	Escolha do <i>Protospacer</i> guia de RNA	109
6.2.4.	Construção do Cassete de RNA guia Híbrido	111
6.2.5.	Construção do Cassete para a Enzima de Restrição Cas9	113
6.2.6.	Escolha do vetor esqueleto para clonagem dos insertos	115
		117
6.2.7.	Nova Construção Plasmidial para Sistema CRISPR/Cas9	117
6.2.8.	Eletroporação de <i>A. tumefaciens</i>	117
6.2.9.	Transformação de isolados de <i>E. coli</i>	118

6.2.10.	Digestão dupla para confirmação dos insertos _____	118
6.2.11.	Co-cultivo de leveduras de <i>Histoplasma</i> e células de <i>Agrobacterium</i> eletrotransformadas 119	119
6.2.12.	Seleção de transformantes de <i>H. capsulatum</i> _____	119
6.2.13.	Mudança de morfologia _____	120
6.3.	RESULTADOS _____	120
6.3.13.	Análise por BLAST para validação da sequência alvo _____	120
6.3.14.	Clonagem no vetor pSIM24 KanR dos Cassetes projetados para edição do gene hsp60 123	123
6.3.15.	Confirmação da transformação genética de células bacterianas e da inserção dos Cassetes nos sítios de clonagem _____	124
6.3.16.	Seleção de clones transformados _____	125
6.4.	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES _____	126
6.5.	PERSPECTIVAS FUTURAS _____	128
7.	DISCUSSÃO e CONCLUSÕES FINAIS _____	129
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	131
ANEXO I	_____	151
ANEXO II	_____	158
1.	Proteínas enriquecidas na superfície celular de <i>Paracoccidoides</i> spp. inseridas como alvos de expressão em construções plasmidiais _____	158
2.	A localização das sequências alvo foi confirmada no DNA plasmidial _____	159
3.	Eficiência da expressão proteica <i>in vitro</i> por células HEK e estímulo da produção de anticorpos pelas vacinas de DNA _____	161
4.	Subclonagem da sequência do carreador de ADP/ATP para o vetor pET28a _____	164

RESUMO

Moura AND. *Triagem e caracterização de antígenos de Paracoccidioides spp. e Histoplasma capsulatum para o desenvolvimento de ferramenta terapêutica baseada em anticorpos monoclonais e quiméricos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Dentre as micoses sistêmicas de maior importância causadas por fungos termodimórficos destacam-se a Paracoccidioidomicose e a Histoplasmose, prevalentes nas Américas. As infecções fúngicas sistêmicas requerem tratamento de longo prazo, e têm sido associadas ao surgimento de novas espécies de microrganismos patogênicos e à progressão da morbimortalidade. Esses fatores são agravados pelo aumento no número de pacientes imunocomprometidos, da resistência fúngica aos medicamentos usuais, e da devastação da natureza. Neste estudo foram desenvolvidas ferramentas visando novas abordagens imunoterapêuticas. Foram utilizadas diferentes estratégias de manipulação genética como a construção de vetores para vacina de DNA, a síntese de Anticorpos Monoclonais Quiméricos e o design de um sistema de edição gênica baseado na técnica de CRISPR/Cas9. A triagem de antígenos de *Paracoccidioides spp.*, discutida no primeiro capítulo, permitiu a identificação das proteínas Histona H2B e Carreadora de ADP/ATP na superfície das células leveduriformes como possíveis novos alvos vacinais. No segundo capítulo mostramos o potencial do anticorpo monoclonal quimérico 4E12 para modificar o curso da Histoplasmose experimental, reduzindo a carga fúngica em pulmões e baços de camundongos. A quimera também aumentou a fagocitose *in vitro* de leveduras de *H. capsulatum* e de *Paracoccidioides lutzii*. No capítulo três discutimos a eficiência da transferência e do direcionamento alvo-específico (sequência obtida do gene para HSP60) da endonuclease Cas9, mediados por *Agrobacterium tumefaciens*, para leveduras de *H. capsulatum*, resultando em sucesso do método aplicado. O estudo mostra a importância da utilização das tecnologias de genômica e proteômica de forma integrada para o rastreamento de alvos antigênicos e para o desenvolvimento de novas terapias, podendo contribuir para um aprimoramento na compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na relação patógeno-hospedeiro e para a elucidação do

papel de antígenos na virulência e patogênese por meio de estudos de perda de função gênica.

Descritores: Paracoccidiodomicose; Paracoccidíoides; Histoplasmose; Histoplasma; Proteômica; Engenharia genética; Chaperonina 60; Quimera; Imunoterapia; Edição de genes.

ABSTRACT

Moura AND. *Screening and characterization of Paracoccidioides spp. and Histoplasma capsulatum antigens for therapeutic tool development based on monoclonal and chimeric antibodies* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Among the systemic mycoses of greater importance caused by thermodimorphic fungi Paracoccidioidomycosis and Histoplasmosis, prevalent in the Americas, stand out. Systemic fungal infections, which require long-term treatment, have been associated with the emergence of new species from pathogenic microorganisms, and the morbidity and mortality progression. These factors are exacerbated by the number of immunocompromised patients increase, due fungal resistance to the usual drugs, and the nature devastation. In this study, tools were developed aiming at new immunotherapeutic approaches. Different genetic manipulation strategies were used, such as the construction of vectors for DNA vaccine, the synthesis of Chimeric Monoclonal Antibodies and the design of a gene editing system based on the CRISPR/Cas9 technique. *Paracoccidioides* spp. antigens screening, discussed in the first chapter, allowed the identification of H2B Histone and ADP/ATP Carrier proteins on the yeast cells surface as possible new vaccine targets. In the second chapter we show the human-mouse chimeric monoclonal antibody potential to modify the experimental Histoplasmosis course, decreasing the fungal burden on the lungs and spleens of mice. The chimera also increased the *in vitro* phagocytosis of yeasts from *H. capsulatum* and *Paracoccidioides lutzii*. In the third chapter we discussed the efficiency of transfer and site-specific targeting (sequence obtained from the gene for HSP60) of the Cas9 endonuclease, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, to the fungus *H. capsulatum*, resulting in method application success. The study shows the importance of using genomics and proteomics technologies in an integrated way for the antigenic targets tracking and for the development of new therapies, which may contribute to an improvement in the understanding of immunological mechanisms involved in the pathogen-host relationship and to elucidate the antigens role in virulence and pathogenesis through loss of gene function studies.

Descriptors: Paracoccidioidomycosis; Paracoccidioides; Histoplasmosis; Histoplasma; Proteomics; Genetic engineering; Chaperonin 60; Chimera; Immunotherapy; Gene editing.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Paracoccidioidomicose

1.1.1. Epidemiologia

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença pulmonar crônica, causada por espécies do gênero *Paracoccidioides*, que afeta indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos (Revisado por (TEIXEIRA et al., 2014)). Trata-se de uma micose sistêmica endêmica na América Latina, a qual apresenta alta incidência de diagnóstico no Brasil, na Argentina, Colômbia e Venezuela (RESTREPO; MCEWEN; CASTAÑEDA, 2001). A progressão de infecção para doença depende do tipo de resposta imunológica do hospedeiro, sendo também influenciada, ou modulada, por questões genéticas, por características demográficas e pelo estilo de vida (MARTINEZ, 2017). O paciente típico é caracterizado por ser trabalhador rural, mas dados mostram que a interação humana com o meio ambiente tem grande impacto na epidemiologia da PCM (MARTINEZ, 2015). Pacientes jovens são acometidos igualmente, sem diferença de gênero. Após a puberdade, cerca de 75 a 95% dos pacientes são do sexo masculino (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017), com idade entre 30 e 50 anos (MARQUES, 2012). Existem indícios de que pacientes do gênero feminino sejam menos propensos a desenvolver a doença devido a produção de estrogênio, hormônio capaz de inibir a transição morfológica de conídios para leveduras (revisto na Ref. (SOUZA; TABORDA, 2020)).

O tabagismo é fortemente associado à forma crônica da PCM, fumantes possuem um risco 14 vezes maior de contrair a micose quando comparados a não

fumantes. O consumo de álcool, numa média superior a 60 ml/dia, também tem sido vinculado à forma crônica (SANTOS et al., 2003). Doença oportunista devido a *Paracoccidioides* spp. foi observada em pacientes com problemas hematológicos ou neoplasias (SHIKANAI-YASUDA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010), em pacientes imunossuprimidos após insuficiência renal ou transplante (PONTES et al., 2015), e em pacientes com deficiência imunológica devido a alterações genéticas (MORAES-VASCONCELOS et al., 2005). Quando associada à AIDS, a PCM possui manifestações clínicas mais graves, o que sugere uma alteração no curso evolutivo da infecção em decorrência da imunossupressão pelo HIV. Em função de aspectos epidemiológicos, vários relatos de casos sugeriram a reativação de focos latentes para *Paracoccidioides* spp. em pacientes HIV positivos (Revisto nas Ref. (SILVA-VERGARA et al., 2003; PANIAGO et al., 2005)). Da mesma forma, os fatores predisponentes à PCM podem favorecer o surgimento de outras doenças simultaneamente. Doença de Chagas, leishmaniose, hanseníase e estrongiloidíase podem ser mais frequentes nos casos de paracoccidioidomicose (BELLISSIMO-RODRIGUES; MACHADO; MARTINEZ, 2011). A doença é mais comumente associada à tuberculose, a qual afeta entre 15 e 20% dos pacientes (QUAGLIATO et al., 2007).

Alterações climáticas, como o aumento da umidade no solo e no ar, são fatores que também podem contribuir para o aumento da incidência de casos da PCM, principalmente das formas agudas e subagudas, em áreas de endemicidade (BARROZO et al., 2009). O desmatamento também tem sido associado ao surgimento de casos de PCM na região amazônica, distúrbios no solo podem aumentar a exposição aos esporos desencadeando surtos (ELLWANGER et al., 2020). Mudanças abruptas nas práticas agrícolas, relacionadas ao desmatamento da floresta amazônica, levaram a um aumento no número de testes positivos para paracoccidioidina e nas taxas de PCM em populações indígenas da tribo Suruí nativas da América Latina (Revisto nas Ref. (RESTREPO; MCEWEN; CASTAÑEDA, 2001; MARTINEZ, 2015)). Além disso, um aumento na taxa de exposição à *Paracoccidioides* spp. observado em Ameríndios vivendo em áreas desmatadas na Amazônia coincide com a perturbação da vegetação nativa ao redor de tocas de tatus (RESTREPO; MCEWEN; CASTAÑEDA, 2001).

1.1.2. Manifestações Clínicas

As formas clínicas da PCM já receberam várias classificações com base em diferentes critérios, como característica da lesão, história natural da doença, gravidade da apresentação clínica e resultados sorológicos. O consenso publicado em 2017 adotou a classificação sugerida no Colóquio Internacional sobre Paracoccidioidomicose, realizado em fevereiro de 1986 em Medellín, na Colômbia (FRANCO et al., 1987), que se apresenta como: Infecção por Paracoccidioidomicose; Forma aguda/subaguda (Forma Juvenil da doença); Forma Crônica (Forma Adulta da doença); e Forma Residual (Sequelas). As formas da doença ainda podem se manifestar como leve, moderada ou grave (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A infecção por PCM é geralmente assintomática e não progressiva, ou se manifesta clinicamente com sintomas inespecíficos e auto-limitados (BUCCHERI et al., 2016), sendo diagnosticada por exame microbiológico direto e exame sorológico. Reações intradérmicas a antígenos específicos, como paracoccidioidina ou gp43, são utilizados para predição epidemiológica (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). A forma aguda/subaguda é responsável por 5 a 25% dos casos de PCM e, no Brasil, tem sido mais comumente observada nos estados do Maranhão, de Minas Gerais, do Pará, de Goiás e de São Paulo (BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2013), não existindo um padrão estabelecido. Essa forma da doença afeta predominantemente crianças, adolescentes e adultos jovens, com incidência distribuída de maneira uniforme entre os sexos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A evolução é rápida, com disseminação do fungo para múltiplos órgãos. Febre, perda de peso e anorexia são sintomas frequentes. Os sintomas também podem incluir a presença de linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, manifestações digestivas, lesões cutâneas ou mucosas, comprometimento osteoarticular e, mais raramente, comprometimento pulmonar. Dentre as alterações laboratoriais destaca-se o aumento no número de eosinófilos, os quais podem representar até 70% dos leucócitos do sangue periférico (FERREIRA, 2009; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A maioria dos casos de PCM se desenvolve sob a forma crônica, e geralmente afeta adultos do sexo masculino com idades entre 30 e 60 anos (SHIKANAI-YASUDA

et al., 2017). O período de incubação na PCM crônica é incerto, mas é provável que a doença ocorra muitos anos após a exposição do paciente à forma infectante de *Paracoccidioides* spp. (MARTINEZ, 2017). A manifestação dos sintomas costuma persistir por até 1 ano, sendo o comprometimento pulmonar observado em 90% dos casos (COSTA et al., 2013). Também são comuns lesões na mucosa das vias aéreas e digestivas superiores, e na pele. Nos casos graves outros órgãos são acometidos, como as glândulas adrenais, o sistema nervoso central (SNC) e os ossos (MARTINEZ, 2017). Os pacientes apresentam perda de peso superior a 10% do peso corporal normal e altos títulos de anticorpos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

1.1.3. Reservatórios e Transmissão

Dentre os reservatórios ambientais de *Paracoccidioides* spp. estão amostras de solo (BAGAGLI et al., 2008), e diversos estudos têm sugerido que animais silvestres, como tatus, podem ser importantes reservatórios primários naturais do fungo. Existem fortes indícios de que *Paracoccidioides* spp. ocorrem preferencialmente em ambientes úmidos, que sofreram alterações na vegetação, preferencialmente em solo arenoso e ácido, e em associação com tatus (BAGAGLI et al., 2003). Há também registros de detecção e isolamento do fungo em ração canina (FERREIRA et al., 1990), no trato intestinal de morcegos (GROSE; TAMSITT, 1965) e em fezes de pinguim (GARCIA et al., 1993). A infecção pode se estabelecer após a inalação de artroconídios, ou de fragmentos de hifas, que se convertem em leveduras nos pulmões (Revisado por (TABORDA; TRAVASSOS; BENARD, 2020)).

1.1.4. Isolados de interesse

Durante muito tempo, *Paracoccidioides brasiliensis* foi considerado o único agente etiológico da PCM (ALMEIDA, 1930). Devido à grande variabilidade genética dos isolados, em 2006, foram propostos 3 grupos filogenéticos distintos dentro da espécie: S1: grupo parafilético com 38 isolados da Argentina, Brasil, Peru e Venezuela

e 1 isolado de pinguim da Antártida, PS2: grupo monofilético com 6 isolados, sendo 5 do Brasil e 1 da Venezuela, e PS3: grupo monofilético com 21 isolados da Colômbia (MATUTE et al., 2006). Além dos grupos filogenéticos citados acima e propostos por Matute et al. (2006), uma análise de regiões codificantes e não codificantes de genes de isolados de *P. brasiliensis*, e de 13 loci gênicos comparando o isolado Pb01 com 122 isolados latino-americanos, sugeriu o isolamento reprodutivo de um grupo monofilético, constituído por isolados Pb01-like, o qual foi classificado como uma nova espécie dentro do gênero causador da PCM e denominada *Paracoccidioides lutzii* (CARRERO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009). O grupo Pb01-like é endêmico nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil (Rondônia, Mato Grosso e Goiás), e compartilha algumas áreas geográficas com o grupo S1 (TEIXEIRA et al., 2009; MARQUES, 2012).

Em 2014 foi descrito outro grupo de espécies crípticas na Venezuela e os isolados foram designados como grupo monofilético PS4 (TEIXEIRA et al., 2014b). Um trabalho mais recente, por Turissini e colaboradores, sugeriu diferenças taxonômicas, morfológicas e moleculares entre os grupos do complexo *Paracoccidioides brasiliensis*. Foi proposto então o reconhecimento de 3 novas espécies, *P. americana* para PS2, *P. restrepiensis* para PS3 e *P. venezuelensis* para PS4 (TURISSINI et al., 2017).

Apesar da patogênese e das manifestações clínicas devido infecção por *P. brasiliensis* ou *P. lutzii* serem indistinguíveis até o momento, a descrição da taxonomia de possíveis novas espécies tem aumentado a curiosidade à respeito das implicações clínicas (HAHN et al., 2019). As diferenças no diagnóstico sorológico e nas características de suscetibilidade às terapias usuais demonstram a necessidade do rastreio de antígenos e da produção de novas preparações antigênicas para o emprego em técnicas como ELISA, Teste de Imunodifusão e látex (GEGEMBAUER et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2015), bem como do desenvolvimento de novas ferramentas e esquemas terapêuticos (HAHN et al., 2019).

1.1.5. Terapia Medicamentosa

A PCM é uma doença geralmente fatal na ausência de tratamento (BORGES-WALMSLEY et al., 2002). Embora haja várias opções antifúngicas, os esquemas terapêuticos atuais requerem administração prolongada, e o paciente deve permanecer sob acompanhamento até que se obtenham os critérios de cura, baseando-se em parâmetros clínicos, radiológicos e sorológicos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006), o que gera maiores custos e aumenta a incidência de toxicidades (TABORDA et al., 2015). Existe também uma frequência significativa de recidivas, o que sugere ineficiência dos antifúngicos na eliminação total dos focos fúngicos (BOCCA et al., 2013).

O itraconazol foi indicado em 1987 como primeira opção terapêutica no controle de formas clínicas leves a moderadas (RESTREPO et al., 1987), a droga apresenta eficiência em 95% dos casos, sendo associada a baixas porcentagens de recidivas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Esse medicamento, no entanto, não é encontrado na rede pública da maioria dos estados brasileiros. A alternativa mais utilizada é a combinação de sulfametoxazol e trimetoprim, recomendada já em 1973 (BARBOSA; VASCONCELOS, 1973), com bons resultados na terapêutica ambulatorial dos pacientes com PCM (SHIKANAI-YASUDA et al., 2002, 2006). Nos casos mais graves, a droga de escolha é a anfotericina B, podendo-se optar também pela associação sulfametoxazol/trimetoprim por via intravenosa (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Mais recentemente, o uso de voriconazol (QUEIROZ-TELLES et al., 2007) ou de fluconazol (MARQUES, 2012) foram sugeridos para o tratamento da PCM no sistema nervoso central, por serem capazes de atravessar a barreira hematoencefálica.

1.2. Histoplasmose

1.2.1. Epidemiologia

A histoplasmose, doença causada por *H. capsulatum*, é uma das infecções primárias respiratórias mais comuns no mundo todo (RAPPEYE; GOLDMAN, 2006), sendo muito prevalente nas Américas Central e do Sul, no leste dos Estados Unidos

e no sul do México (BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2011). Nos Estados Unidos, *H. capsulatum* é altamente endêmico nos vales dos rios Mississippi e Ohio (CANO, 2001). A exposição de pessoas aos conídeos de *H. capsulatum* ocorre com frequência em áreas de endemicidade, mas a infecção assintomática ou doença com manifestações leves são bastante comuns. O quadro mostra-se diferente quando o hospedeiro é imunossuprimido ou quando o inóculo fúngico é robusto, nesses casos a infecção pulmonar geralmente progride levando à disseminação (KAUFFMAN, 2007).

Pacientes que evoluem para a forma disseminada da doença incluem transplantados, pacientes com neoplasias ou problemas hematológicos, pacientes sob terapia com corticóide, e indivíduos soropositivos para HIV (DE ALMEIDA; PEÇANHA; COLOMBO, 2019). Outras condições imunossupressoras vêm se destacando no desenvolvimento da doença na sua forma disseminada refratária e recorrente, como pacientes que recebem antagonistas do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) (WOOD et al., 2003; CRUM; LEDERMAN; WALLACE, 2005), pacientes com deficiência nos Receptores de Interferon-gama (IFN- γ) (ZERBE; HOLLAND, 2005), e pacientes com Síndrome da Hiperimmunoglobulina M (CABRAL-MARQUES et al., 2012). Embora a maioria das infecções sintomáticas ocorram logo após exposições primárias ao *H. capsulatum*, existem casos de reativação da infecção latente que muitas vezes resultam em doença significativa (KAUFFMAN, 2007).

1.2.2. Manifestações Clínicas

A maioria das pessoas infectadas por *H. capsulatum* não apresenta sintomas, ou possui manifestações clinicamente insignificantes (WHEAT et al., 2000; KAUFFMAN, 2003) e autolimitadas (LINDER; KAUFFMAN, 2019), o que se caracteriza por uma Infecção Primária Assintomática. As anormalidades mais frequentes nesses casos são nódulos benignos pulmonares isolados ou adenopatia (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002). Uma taxa inferior a 1%, no entanto, desenvolve sintomas. Uma das manifestações clínicas é classificada como Histoplasmose Pulmonar, subdividida conforme as principais complicações como: Histoplasmose

Pulmonar Aguda, Histoplasmose Pulmonar Cavitária Crônica, Mediastinite granulomatosa, e Fibrose Mediastinal. Outra das manifestações clínicas recebe a classificação de Histoplasmose Disseminada, na qual as complicações mais importantes são Endocardite e Infecção Vasculare e Infecção do SNC (KAUFFMAN, 2007).

A Histoplasmose Pulmonar Aguda é uma doença autolimitada, e acomete principalmente crianças ou adultos jovens (LINDER; KAUFFMAN, 2019). Os sintomas comuns incluem febre, mal-estar, dor de cabeça, fraqueza, tosse improdutiva, e perda de peso (KAUFFMAN, 2007), podendo haver desenvolvimento de pneumonia aguda (LINDER; KAUFFMAN, 2019). Linfadenopatia é também frequente (WHEAT et al., 2004). Manifestações reumatológicas, como mialgias e artralgias, e dermatológicas, comumente eritema nodoso ou multiforme, têm sido descritas em aproximadamente 5% dos pacientes (KAUFFMAN, 2007). Quando o hospedeiro é imunossuprimido, ou caso tenha sido exposto a uma concentração muito alta de inóculo de *H. capsulatum* (WHEAT et al., 2004), o foco de infecção pulmonar frequentemente progride para envolver múltiplos lobos e o paciente pode desenvolver a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (UNIS; ROESCH; SEVERO, 2005). A doença grave deve ser sempre tratada, pois nesse caso há risco de comprometimento respiratório e a recuperação sem a administração de um agente antifúngico é lenta (KAUFFMAN, 2007).

A Histoplasmose Pulmonar Cavitária Crônica se manifesta principalmente em pacientes idosos com doença pulmonar preexistente (LINDER; KAUFFMAN, 2019), estando intimamente associada ao enfisema (DOS SANTOS et al., 2009). Os sintomas comuns no início da doença são semelhantes aos da tuberculose, e se apresentam como tosse, febre e perda de peso. Hemoptise ocorre em cerca de um terço dos pacientes com doença cavitária significativa (LINDER; KAUFFMAN, 2019). A doença é progressiva, havendo espessamento das paredes cavitárias e necrose celular até ficrose tecidual (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002). Em alguns pacientes a necrose é persistente de forma a aumentar a cavidade gradualmente até que todo o lobo seja comprometido, o agravamento recebe o nome de Cavidade em Marcha (KAUFFMAN, 2007; LINDER; KAUFFMAN, 2019). Quando não tratada, a evolução

da insuficiência pulmonar causada pela Histoplasmose Crônica é fatal, levando à morte (KAUFFMAN, 2007).

A Mediastinite Granulomatosa se caracteriza pelo aumento considerável de nódulos, os quais com frequência sofrem necrose caseosa. Algumas vezes é possível encontrar leveduras de *H. capsulatum* no material necrótico por meio de aspiração por agulha ou biópsia (KAUFFMAN, 2007). Muitos pacientes são assintomáticos, enquanto outros apresentam sintomas relacionados à invasão da massa de nodos ao redor das estruturas mediastinais, como a veia cava superior, os brônquios ou o esôfago. A fibrose mediastinal é uma complicação incomum, mas geralmente letal, que pode surgir após a infecção dos linfonodos mediastinais com *H. capsulatum*. A manifestação se caracteriza por uma resposta fibrótica descontrolada que acaba por envolver não só os nodos caseosos como também as estruturas vitais do mediastino (DAVIS; PIERSON; LOYD, 2001).

A Histoplasmose Disseminada é uma doença rara que ocorre principalmente em pessoas imunocomprometidas, especialmente pacientes com infecção pelo HIV, pacientes com neoplasias linforeticulares, e pacientes em tratamento com corticosteróides ou outros agentes imunossupressores. Cerca de 20% dos casos ocorre em pessoas imunocompetentes devido à exposição a alta concentração de inóculo do fungo (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002). Idade avançada é também um fator de risco. Febre, mal-estar, anorexia e perda de peso são os sintomas mais comuns. O exame físico geralmente mostra hepatoesplenomegalia e linfadenopatia. Outros locais freqüentes de disseminação incluem a mucosa orofaríngea, a mucosa gastrointestinal, a pele e as glândulas supra-renais (WHEAT et al., 2000). Em caso de doença grave pode ocorrer coagulação intravascular, insuficiência renal e dificuldade respiratória aguda (KAUFFMAN, 2007). O envolvimento do SNC, apresentando meningite crônica ou lesões cerebrais, ocorre em 5% a 20% dos casos (WHEAT et al., 2000).

1.2.3. Reservatórios e Transmissão

A forma micelial de *H. capsulatum* é encontrada em grande quantidade em excrementos acumulados de aves ou morcegos (CANO, 2001). A infecção geralmente ocorre durante atividades ocupacionais ou recreativas, em áreas endêmicas, que perturbam o solo e sujeira em edifícios antigos, pontes ou cavernas (KAUFFMAN, 2007). O fungo é primariamente adquirido via aerossol pela inalação de microconídeos ou fragmentos de hifas (NOSANCHUK; GACSER, 2008).

Em um estudo realizado no estado de São Paulo, de 2003 a 2008, leveduras de *H. capsulatum* foram isoladas de diferentes espécies de morcegos, um total de 3,7% dos animais capturados pelos Centros de Controle de Zoonose estava infectado. Os animais foram capturados em ambientes diversos como telhados, no solo, dentro e nos arredores de casas ou edifícios, e pendurados em árvores (DIAS et al., 2011).

1.2.4. Isolados de interesse

Quanto ao gênero *Histoplasma*, o número de espécies abrangidas permanece desconhecido, e todas as populações são atualmente classificadas como *H. capsulatum* (SEPÚLVEDA et al., 2017). Três variedades distintas são reconhecidas historicamente de acordo com a morfologia, as manifestações clínicas e a distribuição geográfica, a qual se apresenta como a mais ampla dentre os fungos dimórficos. Esse sistema de classificação subdivide a espécie em *H. capsulatum* var. *Capsulatum* – considerados Patógenos Humanos do Novo Mundo, *H. capsulatum* var. *Duboisii* – Patógenos Humanos Africanos, e *H. capsulatum* var. *Farcimosum* – Patógenos de Cavalos do Velho Mundo (Revisado por (SEPÚLVEDA; WILLIAMS; GOLDMAN, 2014)).

Vários estudos, no entanto, têm demonstrado a existência de grupos isolados geneticamente, Kasuga e colaboradores sugeriram pelo menos 8 clados com 7 espécies filogenéticas – clado Norte Americano 1 (NAm 1), clado Norte Americano 2 (NAm 2), clado Latino Americano A (LAm A), clado Latino Americano B (LAm B), e os clados Austrália, Países Baixos, Eurásia e África (KASUGA et al., 2003). Análises da parede celular fúngica mostraram diferenças na composição com relação à presença

de polissacarídeos -(1,3)-glucana, o que levou à classificação dos grupos em isolados do quimiotipo I (NA_m 2), ou ausência de -(1,3)-glucana, o que levou à classificação em isolados do quimiotipo II (demais grupos) (RAPPEYE; EISSEBERG; GOLDMAN, 2007). Grande parte dos relatos quanto à patogênese e à virulência nos casos de histoplasmose se refere a dois isolados clínicos filogeneticamente distintos, G186A – linhagem H81 de origem Panamenha– quimiotipo II, e G217B – isolado pertencente ao clado NA_m 2 – quimiotipo I (SEPÚLVEDA; WILLIAMS; GOLDMAN, 2014).

Além dos diferentes graus de virulência (SEPÚLVEDA; WILLIAMS; GOLDMAN, 2014), diferenças na suscetibilidade a drogas também já foram observadas. Trabalhos de longa data têm sugerido que o grupo classificado como *H. capsulatum* var. *duboisii* é capaz de causar uma doença com características únicas, o que o posicionaria como uma nova espécie. Análises moleculares também demonstraram que *H. capsulatum* var. *farciminosum* é um grupo polifilético (KASUGA et al., 2003). Compreender se esses achados delimitam novas espécies dentro do gênero *Histoplasma* pode contribuir para a filogenia, para a identificação de estratégias de virulência e no desenvolvimento de novas terapias (SEPÚLVEDA et al., 2017).

1.2.5. Terapia Medicamentosa

A histoplasmose é também uma importante causa de morbimortalidade em indivíduos saudáveis e em pacientes imunodeficientes, representando custos significativos para a saúde (NOSANCHUK et al., 2012). A abordagem terapêutica para pacientes com histoplasmose se encontra documentada em Diretrizes de Prática publicadas em 2007 pela Sociedade de Doenças Infecciosas da América (WHEAT et al., 2007). Itraconazol, voriconazol, e anfotericina B, são os medicamentos de escolha para doenças clinicamente relevantes. Mesmo se tratando de antifúngicos potentes, eles não têm sido capazes de prevenir a mortalidade de cerca de 10% dos pacientes hospitalizados com histoplasmose. Além disso, assim como no tratamento de pacientes com PCM, os agentes antifúngicos são administrados por períodos

prolongados ou mesmo de forma contínua ao longo da vida nos casos de pacientes imunocomprometidos crônicos (NOSANCHUK et al., 2012).

Diante disso, novas abordagens terapêuticas têm sido investigadas no intuito de melhorar a eficácia e reduzir a duração dos tratamentos. Uma das diferentes vias de estudo tem sido a aplicação de anticorpos para modificar as patogêneses da Paracoccidioidomicose (TABORDA et al., 2015) e da Histoplasmose (NOSANCHUK et al., 2012).

1.3. Terapia baseada em anticorpos

Não há consenso na literatura sobre o papel da imunidade humoral em infecções fúngicas, sendo sua importância um assunto controverso (LIONAKIS; ILIEV; HOHL, 2017). Estudos têm dado suporte ao conceito universal de que uma resposta imune eficaz contra fungos depende principalmente de células TCD4⁺ do tipo 1 (Th₁) e de citocinas que ativam macrófagos (CALICH et al., 2008). Entender a relevância da imunidade humoral na proteção contra os fungos pode levar à identificação de anticorpos protetores ou de antígenos imunodominantes, auxiliar no desenvolvimento de vacinas ou de agentes terapêuticos, e também contribuir para o entendimento das interações patógeno-hospedeiro e do curso da patogênese devido à infecções fúngicas (PATHAKUMARI; LIANG; LIU, 2020). A modulação do sistema imune por anticorpos consiste em uma variedade de mecanismos, incluindo inibição da adesão, aglutinação e neutralização do microorganismo, neutralização de toxinas, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos, ativação do sistema complemento, e opsonização. Estudos sugerem fortemente que os resultados divergentes obtidos com preparações de anticorpos policlonais podem ser o resultado de proporções relativas de anticorpos protetores, não protetores, e inibidores em soros imunes (Revisado por (ROMANI, 2004)).

Em 1975, a descoberta de um método para produzir Anticorpos Monoclonais (MAbs) pela imortalização de células B por meio da Tecnologia de Hibridomas permitiu a produção *in vitro* de grandes quantidades de imunoglobulinas com especificidade

definida e com um único isotipo (Revisado por (CASADEVALL; DADACHOVA; PIROFSKI, 2004)). Os MAbs murinos possuem grande potencial terapêutico, no entanto, apresentam meias-vidas curtas quando administrados em seres humanos, além de serem imunogênicos e frequentemente induzirem a produção de anticorpos contra as imunoglobulinas de camundongos nos pacientes (DOS SANTOS et al., 2018). Essa resposta leva à rápida eliminação dos MAbs após administração repetida e ocasiona resistência à terapia (TSURUSHITA; HINTON; KUMAR, 2005). Com o advento da tecnologia de hibridomas, houve também o desenvolvimento de novos métodos para clonagem e de inovações na tecnologia de DNA recombinante que permitiram alterações genéticas nas moléculas para a produção de anticorpos quiméricos e humanizados (PARRAY et al., 2020).

Anticorpos quiméricos são moléculas sintéticas compostas principalmente de sequência codante para anticorpo humano e que mantém a Região Determinante de Complementaridade (CDR – do inglês Complementarity Determining Region) murina. Outras abordagens para humanização de anticorpos foram descritas desde a técnica de CDR grafting, incluindo Resurfacing, Resíduos Determinantes da Especificidade Grafting (SDR), Super-humanização, Human string content optimization, Framework shuffling, e Phage Display (BERNETT et al., 2010). Mutações na região Fc estendem as meias-vidas dos MAbs manipulados para síntese de Anticorpos Quiméricos e Humanizados (HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN et al., 2020). Anticorpos expressos parcial ou completamente a partir de sequências de origem humana são menos imunogênicos, o que diminui a probabilidade do estímulo de uma resposta imune que neutralize o anticorpo terapêutico (HARDING et al., 2010).

Até dezembro de 2019, 79 MAbs terapêuticos haviam sido aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) (LU et al., 2020), em sua maioria para terapia contra câncer, doenças autoimunes e no tratamento de rejeição em transplantes (BUGLI et al., 2013). Anticorpos anti-idiotípicos (anti-IDs) também têm sido alvo de estudo na busca de novos tratamentos contra essas e outras doenças (STANOVA et al., 2020). O sistema imunológico foi descrito por Jerne como uma teia de domínios de região variável interagindo entre si, uma rede idiotípica (JERNE, 1974). Nisonoff e Lamoyi propuseram que determinantes idiotípicos poderiam ser usados como vacinas para doenças infecciosas, substituindo os determinantes antigênicos exibidos por

agentes infecciosos (NISONOFF; LAMOYI, 1981). O princípio da vacinação idiotípica foi aplicado com sucesso em animais com doenças experimentais causadas por vírus e bactérias, além do potencial para o tratamento de câncer e doenças auto-imunes (Revisado por (NAVEED et al., 2018; PAN et al., 2021)).

Até o momento, os MAb's licenciados para terapia de doenças infecciosas são Palivizumab, anticorpo monoclonal humanizado aprovado para uso na prevenção da infecção do trato respiratório pelo Vírus Sincicial Respiratório (VSR) em prematuros com displasia broncopulmonar (EMBLETON; HARKENSEE; MCKEAN, 2005) , o Raxibacumab (2012) e o Obiltoxaximab (2016), aprovados para terapia, em combinação com antibióticos, no tratamento e profilaxia de pacientes adultos e pediátricos com antraz por inalação de *Bacillus anthracis*, quando terapias alternativas não estão disponíveis ou não são apropriadas (TSAI; MORRIS, 2015; GREIG, 2016).

Apesar de existirem relevantes evidências de que a administração de MAb's pode modificar o curso de doenças experimentais causadas por fungos patogênicos, como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides* spp. e *Histoplasma capsulatum* (revisado por (CASADEVALL; PIROFSKI, 2012; TRAVASSOS; TABORDA, 2012)), ainda não há anticorpos terapêuticos com ação antifúngica licenciados para uso em humanos. O fármaco biológico com ação terapêutica antifúngica baseada em anticorpos que chegou mais longe até o momento, alcançou a fase III de ensaio clínico multinacional. O Fragmento Variável de Cadeia Simples (scFV), originalmente denominado Mycograb e posteriormente chamado de Efungumab, foi produzido à partir do cDNA codante para anticorpos anti-HSP90 provenientes de pacientes que tiveram candidíase invasiva e se recuperaram (BUGLI et al., 2013). O Fragmento de anticorpo recombinante geneticamente humano para tratamento de Candidíase deixou de ser produzido pela NeuTec Pharma, uma subsidiária da Novartis AG, devido à auto-agregação de variantes da molécula (RICHIE et al., 2012).

Os altos custos de produção e de armazenamento, quando comparados aos custos gerados no desenvolvimento dos medicamentos antimicrobianos usuais, são apresentados como uma das desvantagens das terapias baseadas em anticorpos. No entanto, os altos custos podem ser compensados por níveis mais baixos de resistência e por um índice menor de infecções nosocomiais, visto que uma terapia

medicamentosa de administração geralmente prolongada e inespecífica, com capacidade de selecionar resistência, incorre em custos adicionais de hospitalização, terapia e acompanhamento do paciente (HASSANI; PATEL; PIROFSKI, 2004). Devido à sua alta especificidade e porque a eficácia dos anticorpos é maior quando administrados no início do curso da infecção, faz-se necessário um rápido diagnóstico para o sucesso da terapia (CASADEVALL; DADACHOVA; PIROFSKI, 2004).

1.4. Sistemas de Edição Genética como ferramenta para o desenvolvimento de novas terapias

O Sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) associado à proteína 9 (Cas9) é um mecanismo natural de defesa bacteriana contra a infecção por fagos e a transferência de plasmídeos. Esse sistema tem sido adaptado para utilização em técnicas de edição de genoma e de modulação epigenética por meio do direcionamento, guiado por RNA, da nuclease Cas9 a uma sequência de DNA específica (CHARPENTIER; DOUDNA, 2013). No sistema CRISPR tipo II, sistema de edição genética mais amplamente utilizado, a endonuclease Cas9 cliva a fita dupla de DNA (DSB – do inglês Double Strand Break) utilizando domínios distintos para cada cadeia, domínio HNH e domínio RuvC. Durante o processo a enzima é guiada por RNA quimérico formado pela combinação de um RNA de interferência (crRNA) e um RNA transativador (tracrRNA) em um único transcrito. O DSB é então reparado pela união final não-homóloga suscetível a erros (NHEJ – do inglês Nonhomologous end Joining) (LIEBER, 2010), que resulta em pequenas inserções aleatórias ou deleções (indels) no local da clivagem. A alteração no sítio específico também pode ser feita por reparo direcionado por homologia sem erros (HDR – do inglês Homology directed repair) (SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008) (Figura 1).

Diferentes adaptações do sistema CRISPR/Cas9 foram desenvolvidas para fungos, podendo cada uma dessas abordagens ser o método mais adequado para diferentes gêneros. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro fungo para o qual essa tecnologia foi aplicada, o sucesso do uso da ferramenta no genoma da

espécie foi obtido devido à sua capacidade em manter a estabilidade de plasmídeos (DICARLO et al., 2013). A manipulação genética por CRISPR/Cas9 em *Candida albicans* proporcionou uma maneira eficiente de gerar mutações e facilitou a engenharia do genoma nesse organismo, técnicas anteriormente executadas na espécie com dificuldade (VYAS; BARRASA; FINK, 2015; MIN et al., 2016; NG; DEAN, 2017). O sistema foi otimizado para fungos filamentosos utilizando *Trichoderma reesei*, no qual o gene para Cas9 foi introduzido no genoma do fungo através de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (LIU et al., 2015).

Essa tecnologia tem permitido o estudo da função de genes envolvidos na patogênese de doenças, a inativação de oncogenes ativados ou a ativação de genes supressores de câncer (CHARPENTIER; MARRAFFINI, 2014; WANG; LA RUSSA; QI, 2016), a análise simultânea de mutações envolvendo vários loci gênicos (CONG et al., 2013), e ainda a identificação de genes alvo ou de resistência a drogas por meio do uso de bibliotecas de RNAs guia únicos (sgRNA) e telas de prospecção contendo genomas inteiros (SHALEM; SANJANA; ZHANG, 2015; DOMINGUEZ; LIM; QI, 2016). Apesar das vantagens, há certas limitações para que se possa explorar todo o potencial terapêutico oferecido pela manipulação genética por Sistema CRISPR (COX; PLATT; ZHANG, 2015; DOUDNA; GERSBACH, 2015). É frequente que haja sequências de homologia comuns entre o alvo e outras regiões do genoma a ser modificado, portanto a integração aleatória do gene CAS9 no genoma do hospedeiro pode induzir mutações indesejadas exigindo a triagem de vários transformantes. A expressão constitutiva ou a retenção prolongada de CAS9 nas células hospedeiras também pode gerar efeitos fora do alvo (KUSCU et al., 2014). Reduzir ou evitar mutações em sequências inespecíficas é fundamental para o uso eficaz da engenharia do genoma mediado por CRISPR em aplicações clínicas (SANDER; JOUNG, 2014; TSAI; JOUNG, 2016).

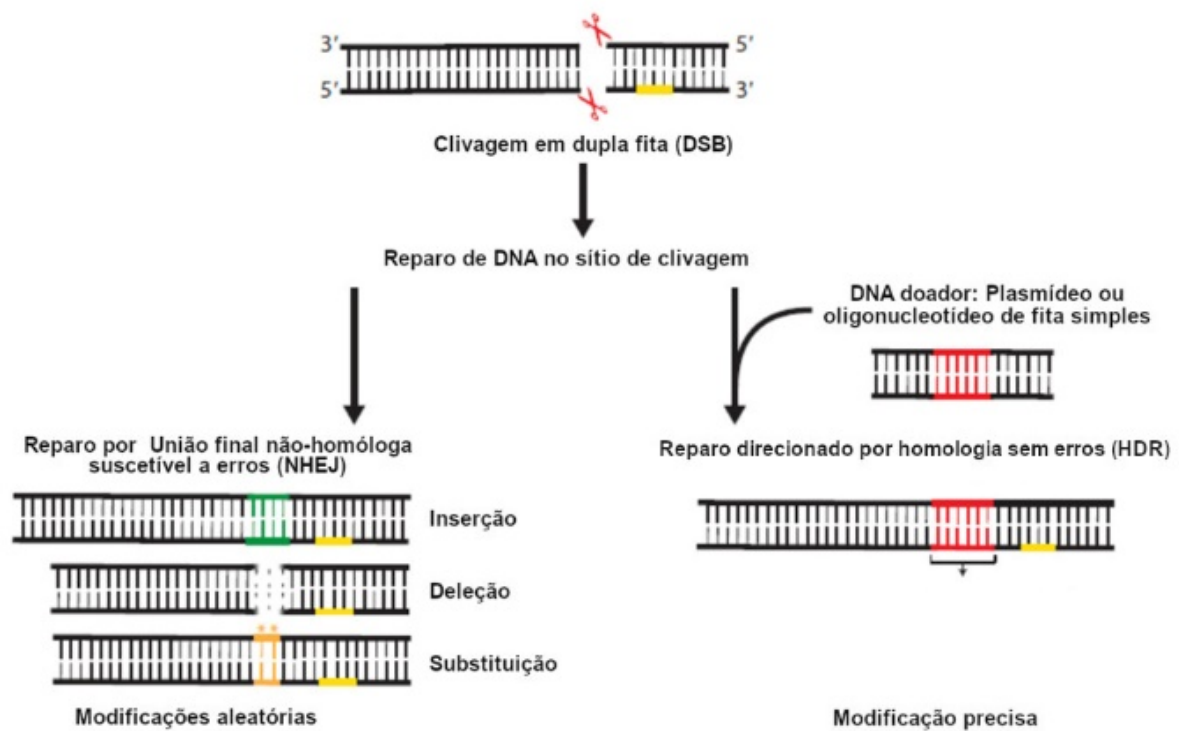


Figura 1. Mecanismos de edição de genoma por CRISPR-Cas9.

O sgRNA sintético direciona uma endonuclease Cas9 para a sequência alvo complementar à sequência de RNA guia de 20 nucleotídeos para introduzir uma DSB no DNA genômico. A clivagem gerada é reparada por mecanismos mediados pelo hospedeiro. Na ausência de um modelo de reparo, o NHEJ é ativado e causa inserções, exclusões ou substituições aleatórias, frequentemente resultando na interrupção da função do gene. Na presença de um doador de DNA contendo uma sequência homóloga à sequência de interesse, o HDR é ativado para criar mutações geradas por recombinação homóloga.

Para superar essas limitações, sistemas de expressão transitória do gene CAS9 e do sgRNA foram estabelecidos em fungos filamentosos, o modelo utilizado para o desenvolvimento da técnica foi o fungo *Neurospora crassa* (MATSU-URA et al., 2015). Em um dos primeiros estudos utilizando esse método, Nødvig e colaboradores mutaram com sucesso o gene *yA*, que codifica para uma p-difenol oxidase necessária à síntese de pigmento verde dos conídios, em *Aspergillus nidulans* (NØDVIG et al., 2015). A metodologia serviu de base para o emprego do sistema CRISPR/Cas9, na tentativa de aumentar a eficiência da edição de genes em *Blastomyces*, pelo grupo de pesquisa do Dr. Bruce S. Klein (KUJOTH et al., 2018). Devido à natureza diversa do reino fúngico, pode ser difícil desenvolver um método

universal para edição de genes. Os desafios durante o processo de desenvolvimento de um sistema CRISPR/Cas9, para um fungo específico, incluem a determinação do método e do promotor ideais para expressão do gene CAS9, e a identificação de um Sinal de Localização Nuclear (NLS) adequado à sua translocação para o núcleo (WANG; COLEMAN, 2019). A adaptação da tecnologia CRISPR/Cas9 para modificação genômica de fungos de importância médica pode ajudar a desvendar a função de genes específicos e determinar sua importância na virulência e na patogenicidade. Com a descoberta de genes essenciais, alvos em potencial também podem ser manipulados para o desenvolvimento de novas terapias.

1.5. Antígenos de relevância como alvos terapêuticos

O acompanhamento sorológico dos pacientes com PCM é fundamental para se avaliar a progressão da doença. O antígeno majoritário de *P. brasiliensis* (gp43) foi isolado por Puccia e colaboradores em 1986, a partir de filtrado de cultura do isolado PbB339 fornecido por A. Restrepo-Moreno, Medellín, Colômbia. A gp43 foi imunoprecipitada com anticorpos monoespecíficos para o antígeno da banda E (PUCCIA et al., 1986), previamente extraído e purificado do fungo na sua fase micelial por Yarzabal e colaboradores (YARZABAL et al., 1977), validando a glicoproteína como um antígeno específico de *P. brasiliensis*. A glicoproteína de 43.000 MW foi reativa com todos os soros de pacientes com PCM causada por *P. brasiliensis*, tanto em testes de radioimunoprecipitação como em testes de imunodifusão (PUCCIA et al., 1986). Devido ao seu baixo rendimento, preparados antigênicos brutos contendo a gp43 são utilizados para fins diagnóstico em testes sorológicos.

Quando o agente causador da infecção é da espécie *P. lutzii*, esse preparado não é reconhecido, ou é fracamente reconhecido, pelo soro da maioria dos pacientes acometidos devido equivalência de apenas 81% da sequência peptídica da glicoproteína extraída de *P. brasiliensis* com a de seu ortólogo em *P. lutzii*, região identificada como Plp43 (LEITÃO et al., 2014). A ocorrência de reações falso negativas em soros de pacientes infectados por *P. lutzii* sugere que a preparação com apenas um antígeno não é recomendada. Como antígeno alvo para métodos

profiláticos ou terapêuticos foi capaz de induzir a produção de MAbs protetores na PCM experimental causada por *P. brasiliensis*. O MAb 3E, isotipo IgG2b, se mostrou mais eficiente na redução de carga fúngica após imunização passiva e no aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos, aumentando também a fagocitose de leveduras opsonizadas (BUISSA-FILHO et al., 2008).

Outra glicoproteína de interesse, identificada como importante fator de virulência para as espécies *Sporothrix* (NASCIMENTO et al., 2008) e como mecanismo de escape para as espécies de *Paracoccidioides*, é a glicoproteína de 70 kDa (gp70). A imunização passiva com MAbs IgG1 contra gp70 (C5F11 e B7D6) reduziu o UFC nos pulmões de animais com PCM por *P. brasiliensis* (DE MATTOS GROSSO et al., 2003). Estudos demonstraram que um MAb IgG1 contra gp70 (P6E7) diminuiu significativamente as infecções *in vivo* devido a *Sporothrix schenckii* e *S. brasiliensis* (NASCIMENTO et al., 2008; DE ALMEIDA et al., 2017). Baseando-se nesses dados, o anticorpo contra gp70 foi humanizado como fragmentos FvFc. O anticorpo humanizado não perdeu sua afinidade e manteve a capacidade de se ligar ao antígeno, além disso, o tratamento de camundongos com esporotricose experimental levou à redução da carga fúngica no baço (DE ALMEIDA et al., 2017).

O antígeno M é uma glicoproteína encontrada na superfície celular de *H. capsulatum*, com função de catalase (GUIMARÃES et al., 2008), utilizada no diagnóstico da Histoplasmose aguda. Três MAbs produzidos contra o antígeno M, dos isotipos IgM e IgG2a, foram capazes de aumentar a fagocitose de células leveduriformes de *Histoplasma* quando opsonizadas (GUIMARÃES et al., 2008).

Proteínas de choque térmico, HSPs (do inglês Heat Shock Proteins), são alternativas possíveis como segundo antígeno, por serem, em geral, altamente imunogênicas. Estas proteínas constituem uma família de moléculas evolutivamente conservadas encontradas em células procarióticas e eucarióticas (BURNIE et al., 2006). A maioria das HSPs são expressas constitutivamente e desempenham um papel protetor durante as mudanças de temperatura ou em condições de estresse ambiental, como lesão oxidativa, acidez e a presença de medicamentos citotóxicos (NICOLA; ANDRADE; SILVA-PEREIRA, 2005; NICOLA et al., 2008). A capacidade de transição morfológica é essencial para a progressão da doença e para a disseminação da infecção a outros tecidos, devido à fungos dimórficos (NEMECEK; WÜTHRICH;

KLEIN, 2006). Durante essa conversão, *Paracoccidioides* spp. e *H. capsulatum* expressam, dentre outras moléculas, diferentes HSPs (SHAPIRO; COWEN, 2010), o que facilita a adaptação e promove a capacidade de evasão das respostas efetoras hospedeiras (CLEARE; ZAMITH-MIRANDA; NOSANCHUK, 2017).

As HSPs são alvos potenciais para MAb's terapêuticos, por serem antígenos imunodominantes conservados capazes de estimular respostas imunológicas celular e humoral durante a infecção (Revisado por (CLEARE; ZAMITH-MIRANDA; NOSANCHUK, 2017)). Guimarães e colaboradores caracterizaram MAb's direcionados à HSP60 de *H. capsulatum*. Anticorpos com isotipos IgG1 e IgG2a foram protetores na Histoplasmose experimental murina, reduzindo a inflamação, impedindo a replicação intracelular e prolongando a sobrevivência dos animais (GUIMARÃES et al., 2009). Um estudo de Thomaz e colaboradores demonstrou que MAb's produzidos contra HSP60 de *H. capsulatum* são biologicamente ativos contra *P. lutzii*, reduzindo significativamente a carga fúngica e os danos no tecido pulmonar de camundongos com PCM (THOMAZ et al., 2014).

Outros mecanismos importantes para a coordenação da resposta imune são a regulação da transdução de sinais, de respostas efetoras, e alterações epigenéticas, pelos Fatores de Transcrição (COLE et al., 2016). Mudanças Pós-traducionais (PTMs) de Histonas têm sido amplamente estudadas na regulação de transcrição gênica (SHAHBAZIAN; GRUNSTEIN, 2007), influenciadas também pelo ambiente celular que sofre alterações durante processos infecciosos (JENUWEIN; ALLIS, 2001). PTMs de Histonas podem influenciar na diferenciação de monócitos para células dendríticas ou macrófagos (HEINZ et al., 2010). Octômeros de histonas, compostos por 2 cópias de cada uma das proteínas H2A, H2B, H3 e H4, constituem as unidades de nucleossomos componentes da cromatina celular (OLINS; OLINS, 2003). Análises de proteômica durante infecção em macrófagos alveolares por *Paracoccidioides brasiliensis* mostrou aumento na capacidade de sobrevivência e multiplicação intracelular do fungo por meio da modulação de expressão gênica. Proteínas Histonas foram super reguladas após 6 horas de infecção (CHAVES et al., 2019).

As histonas têm sido cada vez mais descritas na superfície celular de células hospedeiras e de patógenos como *Mycobacterium leprae* (DE MELO MARQUES et al., 2000; MARQUES et al., 2001) e *M. smegmatis* (PETHE et al., 2001). Nosanchuk

e colaboradores identificaram a Histona H2B na superfície celular de *H. capsulatum*. Um painel de MAbs gerado após imunização de camundongos com células leveduriformes de Histoplasma inativadas por calor levou a identificação de um anticorpo monoclonal do isotipo IgM capaz de se ligar especificamente à proteína. A infecção de camundongos com células de levedura de *H. capsulatum* previamente incubadas com o MAb anti-H2B levou à redução da carga fúngica e dos danos inflamatórios pulmonares, e aumentou a sobrevivência dos animais, quando comparado ao grupo infectado apenas com leveduras de Histoplasma (NOSANCHUK et al., 2003).

A super regulação de enzimas durante a interação com macrófagos é também um dos mecanismos moleculares utilizados pelas espécies de *Paracoccidioides* para aumentar a sobrevivência do fungo dentro dos fagócitos. A modulação do metabolismo fúngico gera uma resposta ao estresse oxidativo, sendo a expressão de enzimas atpases, por exemplo, aumentada em cerca de 4,85 vezes (ALVES PARENTE-ROCHA et al., 2015). Chaves e colaboradores demonstraram que a interação de células leveduriformes de *P. brasiliensis* com macrófagos não ativados levou a uma adaptação metabólica mais rápida, ativando rotas alternativas de cadeia de transporte de elétrons e de síntese de ATP (CHAVES et al., 2019).

Um outro estudo identificou genes específicos para cada fase do fungo *H. capsulatum* se utilizando da técnica de Microarray genômico. Genes que codificam para proteínas ligantes de ATP e para transportadores de membrana de efluxo dependentes de ATP foram mais expressos na fase leveduriforme do que na fase micelial (HWANG et al., 2003). Utilizando a Técnica Diferencial de Transcrição Reversa da Reação da Cadeia da Polimerase (DDRT-PCR) foi possível identificar e caracterizar genes induzidos durante interação do isolado G217B de *H. capsulatum* com macrófagos. Um dos genes encontrados, expressos diferencialmente, após 8 horas de infecção em macrófagos por Histoplasma, Mg1, codifica uma proteína ligante de ATP envolvida no transporte de cálcio (PORTA; MARESCA, 2000).

Diante da importância e da prevalência da PCM e da Histoplasmose nas Américas, e da necessidade de aumento na eficácia e redução na duração dos tratamentos antifúngicos, antígenos provenientes de isolados das espécies *P. brasiliensis*, *P. lutzii* e *H. capsulatum* foram analisados quanto ao seu potencial

terapêutico. Abordagens terapêuticas baseadas em métodos de manipulação genética têm sido utilizadas com sucesso na compreensão do papel de antígenos na patogênese, como na tecnologia de CRISPR/Cas9, e na síntese de anticorpos quiméricos ou humanizados. Nesse estudo, sequências antigênicas obtidas de extratos proteicos de *Paracoccidioides* spp. e analisadas por proteômica levaram à identificação de Histona H2B e de um Carreador de ADP/ATP como proteínas enriquecidas nas superfícies das leveduras. O antígeno HSP60, de relevância reconhecida pela comunidade científica, também foi utilizado no estudo para o desenvolvimento de um sistema de interrupção gênica e para a síntese de um Anticorpo Monoclonal Quimérico.

2. JUSTIFICATIVA

O tratamento de Infecções Fúngicas Invasivas, frequentemente feito com drogas de administração prolongada, continua sendo um grande desafio em todo o mundo. Mesmo os medicamentos antifúngicos mais eficazes podem oferecer riscos de toxicidade, aqueles que são bem tolerados frequentemente induzem resistência, e a mortalidade por doenças fúngicas, ainda quando tratadas, pode ser superior a 40%. Diante desse cenário novas abordagens terapêuticas estão sendo adotadas, sendo as terapias baseadas em anticorpos uma alternativa promissora. Estudos com MAbs têm fornecido resultados importantes sobre a relação patógeno-hospedeiro e a imunomodulação, e revelado uma gama de alvos em potencial. Essas informações, agregadas aos adventos tecnológicos e a manipulação genética, oferecem os meios para que ocorram avanços na busca por terapias antifúngicas mais eficazes e efetivas.

Neste trabalho serão discutidos novos alvos terapêuticos e terapias baseadas em anticorpos manipulados geneticamente contra *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides* spp..

3. OBJETIVO GERAL

Realizar a prospecção e avaliar antígenos provenientes de *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides* spp. para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas para o tratamento de Histoplasmose e de Paracoccidioidomicose por diferentes métodos de manipulação genética.

4. CAPÍTULO I: Triagem de alvos terapêuticos extraídos de *Paracoccidioides* spp.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1.1.** Extrair compostos de parede celular e exoantígenos de células leveduriformes de isolados de *Paracoccidioides* spp;
- 4.1.2.** Realizar triagem por testes de reatividade contra soros policlonais obtidos de camundongos com PCM experimental e de pacientes diagnosticados com PCM;
- 4.1.3.** Identificar moléculas de interesse por Espectrometria de Massa a partir de grupos selecionados que apresentarem potencial imunogênico;

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Isolados

Foram utilizados os isolados Pb01, Pb66 e Pb8334, pertencentes ao Grupo Pb01-like, e Pb18, representando a espécie *P. brasiliensis*.

4.2.2. Condições de cultivo

Os isolados foram cultivados em Caldo Fava Netto, sob agitação de 180 rpm, à 37°C. Após 15 dias, as células foram tratadas com timerosal 0,2 g/L, *overnight*, e centrifugadas à 3000xg, por 10 minutos, para obtenção de massa fúngica. A manutenção foi feita em meio Fava Netto Agar, à 37°C, com repiques a cada 14 dias.

4.2.3. Preparação do inóculo e Infecção experimental para obtenção de soro policlonal

As células leveduriformes (Pb01, Pb66, Pb66 e Pb18) foram lavadas 3 vezes em Solução Tampão Fosfato-Salina (PBS). A viabilidade celular foi determinada por microscopia de contraste de fase, após coloração com Azul de Tripano. Os tubos fálcon foram invertidos suavemente até que as suspensões estivessem homogêneas, o inóculo foi ajustado para 5×10^6 leveduras viáveis em 50 μ L. Após anestesia com solução contendo Cetamina 100 mg/mL e Xilasina 10 mg/mL (100 μ L/animal), foi realizada infecção intratraqueal com auxílio de seringa, por meio de incisão transversal, e a sutura feita com fio cirúrgico. Os soros foram coletados do plexo ocular a cada 15 dias. Os animais foram eutanasiados após 60 dias de infecção. Os experimentos seguiram protocolo aprovado pelo CEUA/FMUSP.

4.2.4. Soros de pacientes diagnosticados com PCM

Os soros contra *P. brasiliensis* (confirmados após testes sorológicos positivos na presença do exoantígeno majoritário gp43) e prováveis contra *P. lutzii* foram obtidos na soroteca do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo/FMUSP. O projeto possui autorização do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (CEP-HCFMUSP), protocolo 4.080.545.

4.2.5. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos machos da linhagem BALB/c, com 5 a 7 semanas de idade. O projeto possui autorização para uso de animais em experimentação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FMUSP), protocolo 041/16.

4.2.6. Extração de compostos celulares

4.2.6.1. Extração e Quantificação de Proteínas

As leveduras (Pb01, Pb66, Pb8334 e Pb18) foram lavadas 3 vezes em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7.4. A ruptura de células foi feita por lise mecânica em vórtex na presença de inibidores de protease (Sigmafast Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free/ Sigma-Aldrich São Paulo/Brasil). O sobrenadante com proteínas solúveis (citossólicas) foi coletado e armazenado à -20°C.

As células decantadas foram lavadas 3 vezes com água destilada e, em seguida, com soluções NaCl 5%, 2%, e 1% (J.T.Baker - Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA), acrescidas de Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) 1 mM (Thermo Fisher Scientific, São Paulo/Brasil). A extração de proteínas de superfície foi feita em solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, contendo EDTA 0.1 M, SDS 2% e Dithiothreitol (DTT) 10 mM (Thermo Fisher Scientific, São Paulo/Brasil), a 100 °C, por 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante (proteínas de membrana e de parede) foi coletado e armazenado à -20°C. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), as leituras foram feitas em triplicata.

4.2.6.2. Extração de Glicopeptídeos

As células fúngicas foram ressuspensas em tampão citrato 0,02 M, pH 7, autocladas por 90 min, à 120 °C, e precipitadas com etanol (3 H₅C₂OH : 1 amostra) (Labsynth, São Paulo/Brasil) e HCl absoluto (2 gotas) (Labsynth, São Paulo/Brasil). As amostras foram diluídas, dialisadas contra água e extraídas com Cetavlon (Hexadecyltrimethylammonium bromide, Sigma-Aldrich São Paulo/Brasil) conforme método descrito por Lloyd, 1970. Não foi possível determinar a concentração por métodos espectrofotométricos de quantificação.

4.2.6.3. Extração de Glicolipídeos e separação das frações por Cromatografia de Exclusão por Tamanho

As extrações foram feitas em solução de clorofórmio:metanol (2:1) overnight, sob agitação, e filtradas à vácuo em Kitassato. Após concentração em rotaevaporador, as amostras foram ressuspensas em solução de clorofórmio:metanol:KCl 0,75% (8:4:3) e fracionadas em funil de separação por método de Folch (FOLCH; LEES; SLOANE, 1957). As fases foram concentradas em rotaevaporador e aplicadas em coluna empacotada com Sílica Gel 60. A separação dos compostos foi feita em 3 etapas: com clorofórmio, acetona, e metanol (Synth, Diadema/SP). Os eluatos foram evaporados e armazenados à -20°C. Quantificação por método de Dubois resultou em baixo valor de R e não foi reprodutível após replicatas.

4.2.7. Análise eletroforética de proteínas e glicopeptídeos

As amostras com os extratos proteicos (1,5 mg/mL por poço) ou glicoproteicos (5:1 em relação ao tampão de amostra) foram aplicadas em gel de poliacrilamida. A eletroforese foi feita sob condições redutoras (β -mercaptoetanol). As bandas foram reveladas com Comassie Blue 250R 0,1% (Serva, Heidelberg/Germany) (preparado

em etanol 40% e ácido acético 10%) e/ou Corante de Schiff (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

4.2.8. Análise de glicolipídeos por TLC

Os eluatos foram aplicados em membrana de sílica gel 60 F254 (Sigma-Aldrich, São Paulo/Brasil) para análise das bandas por Cromatografia de Camada Delgada, solução de clorofórmio:metanol:água (65:25:4) foi utilizada como fase móvel. As bandas foram reveladas com Iodo e Orcinol (Merck KGaA, Darmstadt/Germany).

4.2.9. Detecção e triagem de antígenos com anticorpos policlonais

4.2.9.1. Dot blot

O procedimento foi realizado em Aparato de Microfiltração Bio Dot (Bio Rad), e os poços foram sensibilizados, durante a noite, com 25 µL das amostras de glicopeptídeos e glicolipídeos. Extratos proteicos (10 µg) foram utilizados como controle positivo. As membranas ficaram em solução de bloqueio (BSA 3% (Inlab, São Paulo/SP) em PBS 1X Tween 0,05%) por 1h. Os anticorpos primários testados foram soros de camundongo contra isolados Pb01-like e anti Pb18. Soro contra *H. capsulatum* foi testado para reatividade cruzada. Detecção foi feita com anticorpo secundário anti-IgG conjugado à biotina e solução de estreptavidina/HRP (BioRad – Biotika Biotecnologia, São Paulo/Brasil). A revelação foi feita com Kit ECL (Peróxido + Luminol) (Sinapse Biotecnologia - GE Healthcare, São Paulo/Brasil) e leitura por quioluminiscência em Fotodocumentador (Gel Doc XR + Gel Documentation System – BioRad) utilizando os filtros Dylight, Alexa 488 e Sypro Ruby. Entre cada etapa foram feitas lavagens com PBS 1X T 0,05%.

4.2.9.2. Western Blot

As proteínas extraídas dos isolados de *Paracoccidioides* spp. foram fracionadas por eletroforese, 30 µg por poço, e transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences do Brasil) por meio do aparelho Trans Blot Semi Dry (Bio Rad), durante 15 minutos à 15V. Os anticorpos primários testados foram soros policlonais de camundongo contra os isolados Pb01 like e soro policlonal anti Pb18, coletados com 15 e 30 dias de infecção, e soros humanos contra *P. brasiliensis* e provável contra *P. lutzii*. Etapas de bloqueio, lavagem, detecção e revelação foram as mesmas aplicadas no Dot Blot.

4.2.10. Análise Proteômica

Após eletroforese desnaturante, as bandas de proteína previamente escolhidas foram extraídas dos geis de poliacrilamida, digeridas com tripsina, e analisadas por Cromatografia Líquida acoplada a um Espectrômetro de Massa Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific), como descrito em detalhes nos trabalhos de Shevchenko *et al* e Gan *et al* (SHEVCHENKO *et al.*, 2007; GAN *et al.*, 2019). Os dados foram processados com o software MaxQuant (v 1.6.5.0) (TYANOVA; TEMU; COX, 2016). As sequências de *P. brasiliensis* (isolado Pb18) e *P. lutzii* (isolado Pb01) armazenadas na Uniprot Knowledgebase foram utilizadas como base para pesquisa e identificação dos peptídeos. A tolerância de erro de massa foi ajustada para 20 ppm na primeira rodada e, após a recalibração, para 4,5 ppm. A oxidação da metionina foi considerada uma variável, e apenas os peptídeos clivados com tripsina em ambos os terminais foram pesquisados. Para comparação entre as amostras, os valores de iBAQ (Quantificação Absoluta baseada em Intensidade) foram normalizados pela massa molecular da proteína e, em seguida, pela massa total da amostra, o que resultou na massa proteica relativa (SCHWANHÜSSER *et al.*, 2011).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Análise do perfil de macromoléculas pela separação e detecção de frações

Os extratos de glicolipídeos foram purificados por método de Exclusão por Tamanho (SEC) e os eluatos obtidos foram fracionados por TLC. A quantificação foi feita por método de Dubois, vale ressaltar que a técnica tem limitações, pois depende da dosagem de amostras diluídas em solventes orgânicos voláteis e é baseado em açúcares. Os perfis mostraram complexidade e resultados diversos (Dados não mostrados), o que dificultou a reprodutibilidade e análise. Quanto aos extratos glicoproteicos, diálises foram necessárias a fim de eliminar impurezas, resultando em um baixo rendimento, como demonstrado na figura 10 pela coloração com Nitrato de Prata. Geis corados com Schiff revelaram a presença de grande quantidade de açúcares (Figura 2).

Os extratos brutos foram analisados quanto à reatividade utilizando a técnica de Dot Blot, não sendo possível a análise dos compostos separadamente devido à dificuldade no fracionamento das amostras. Amostras contendo extratos glicolipídicos foram reativas com soros policlonais coletados de camundongos com PCM experimental. Nenhuma reatividade foi detectada contra as amostras de glicopeptídeos (Figura 3).

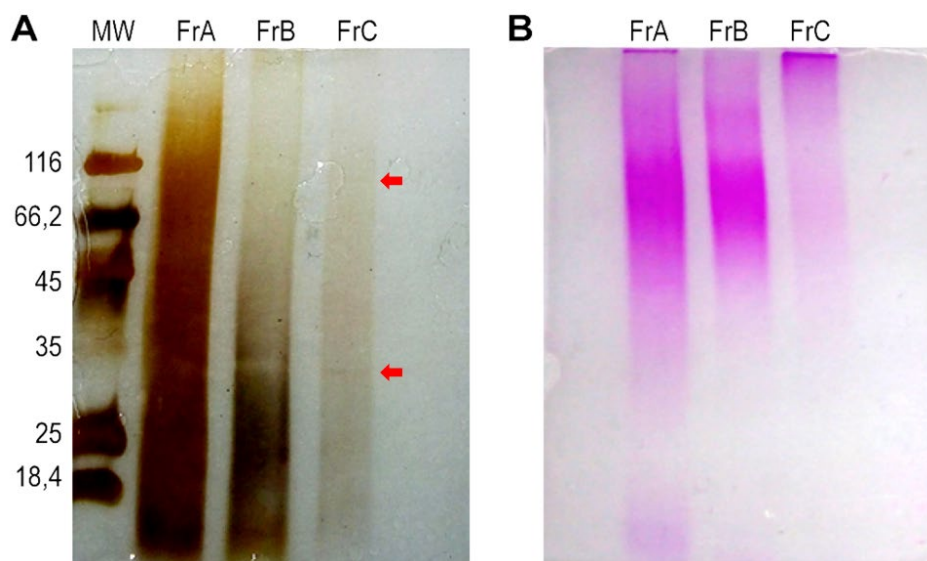


Figura 2. Fracionamento de extratos glicoproteicos por SDS-PAGE.

Os extratos com glicoproteínas obtidos de leveduras de *Paracoccidioides* spp. se mostraram pouco solúveis e com grande quantidade de glicídeos. **A)** Coloração por nitrato de prata. **B)** Coloração por ácido periódico de schiff. **FrA.** Amostra após primeira diálise. **FrB.** Amostra após segunda diálise. **FrC.** Glicoproteínas solúveis.

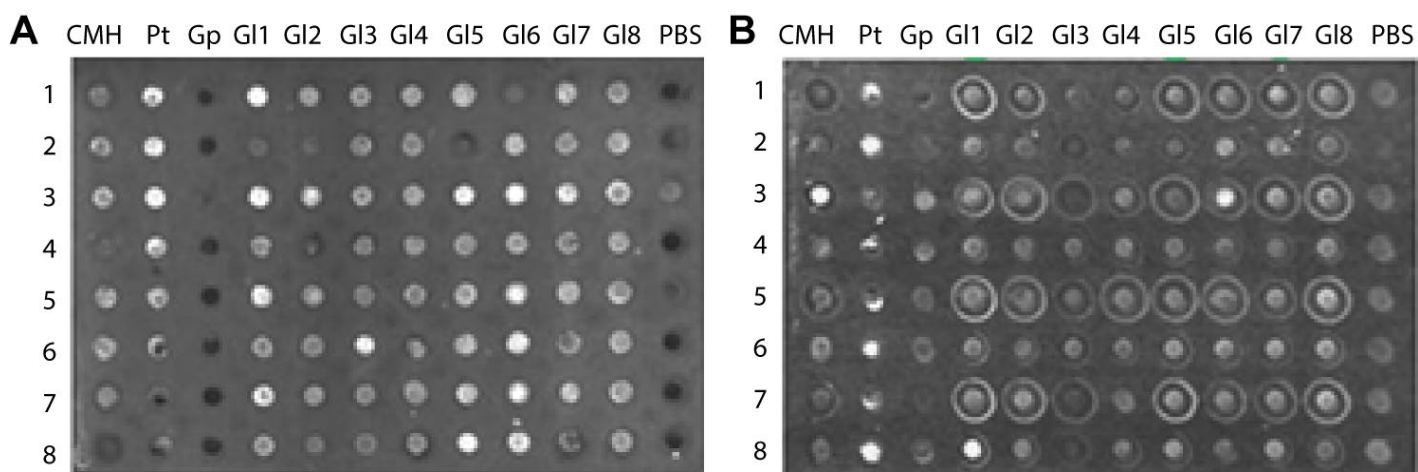


Figura 3. Detecção de glicocompostos extraídos de *Paracoccidioides* spp. por Dot Blot.

A maioria das amostras de glicolipídeos mostrou reatividade com soros de camundongos infectados com isolados de *P. lutzii*. As amostras tiveram pouca, ou nenhuma, reatividade com soros anti-Pb18 e anti-G217B. Os extratos glicoproteicos não foram detectados. **A)** Detecção com soros policlonais anti-Pb01 Like coletados de camundongos com PCM experimental. **Linhas 1 e 2:** Soro anti-Pb66; **Linhas 3 e 4:** Soro anti-Pb01; **Linhas 5 e 6:** Soro anti-Pb8334; **Linhas 7 e 8:** Controle Negativo (Soro de animais imunizados com PBS). **B)** Detecção com soros policlonais anti-Pb18 e anti-*H. capsulatum* (isolado G217B) coletados de camundongos com infecção experimental. **Linhas 1 e 2:** Soro anti-Pb18; **Linhas 3 e 4:** Soro anti-G217B; **Linhas**

5 e 6: Controle Negativo (Soro de animais imunizados com PBS); **Linhas 7 e 8:** Controle Negativo (Soro de animais não imunizados). **CMH:** Monohexosilceramida (Controle Positivo); **Pt:** Extrato proteico (Controle positivo); **Gp:** Extratos glicoproteicos; **GI:** Extratos glicolipídicos; **PBS:** Solução Fosfato-Salina (Controle Negativo).

Devido às limitações nas estratégias de separação e identificação, e ao desafio de produzir anticorpos com alta afinidade contra glicocompostos, as proteínas foram selecionadas como alvo para triagem de antígenos. Soros provenientes de camundongos infectados com os isolados Pb18, Pb01, Pb66 e Pb8334, ou pools de soros coletados de pacientes diagnosticados com PCM (*P. brasiliensis* ou provavelmente por *P. lutzii*), foram utilizados em testes de Western Blot. Foi observada reatividade com perfis diversos. As bandas com maior reprodutibilidade, de

aproximadamente 15 e 30 Kdas, foram selecionadas para análise proteômica (Figura 4 e Figura 5).

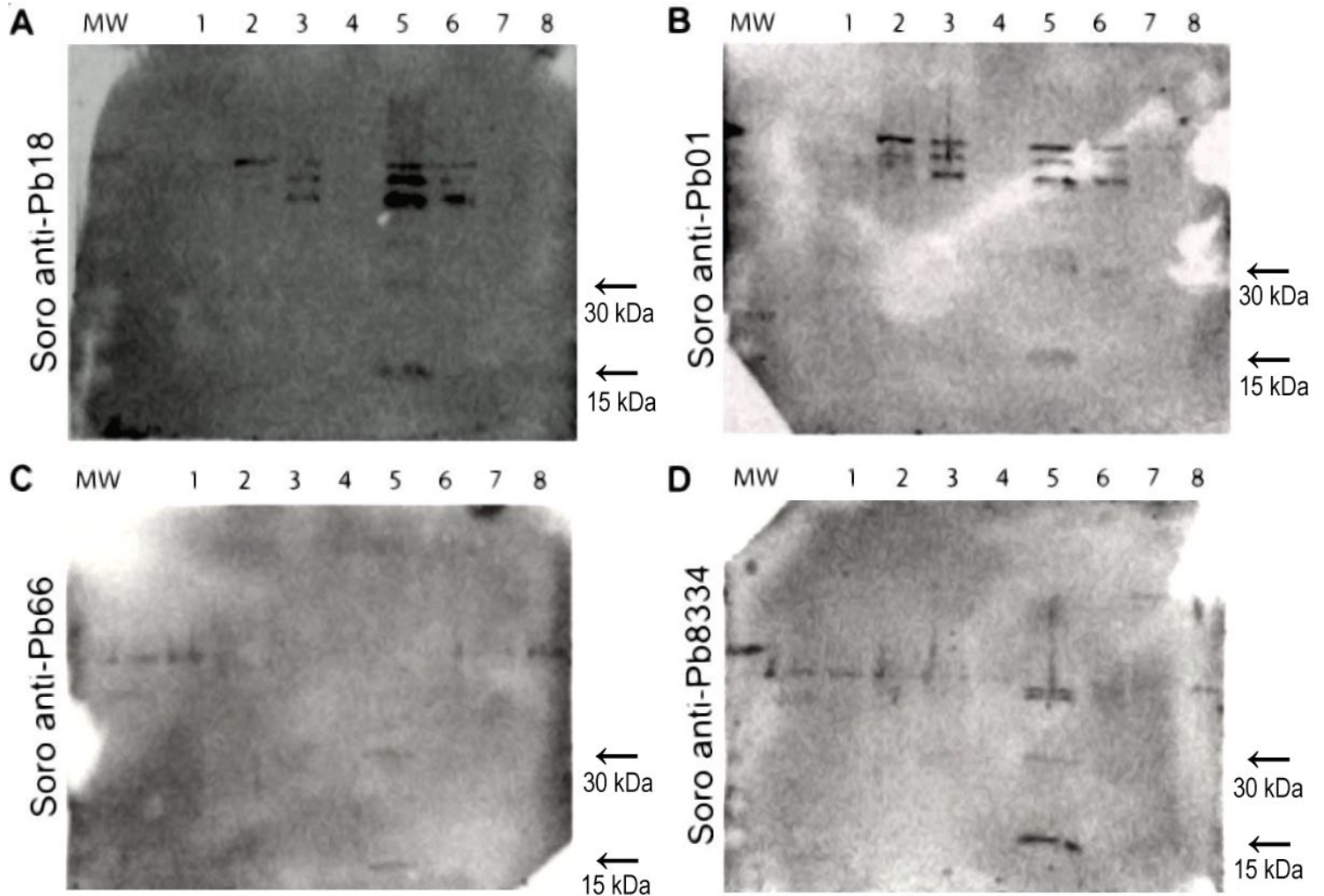


Figura 4. Detecção de proteínas com soros obtidos de camundongos com PCM experimental por Western Blot.

Quadros A e B: Perfis semelhantes foram obtidos após detecção de extratos proteicos de *Paracoccidioides* spp. com soros coletados de camundongos infectados com os isolados Pb18 e Pb01. **Quadros C e D:** Perfis semelhantes foram obtidos após detecção de extratos proteicos de *Paracoccidioides* spp. com soros coletados de camundongos infectados com os isolados Pb66 e Pb8334. **1)** Extrato proteico citosólico de Pb18; **2)** Extrato proteico citosólico de Pb01; **3)** Extrato proteico de superfície de Pb01; **4)** Extrato proteico citosólico de Pb66; **5)** Extrato proteico de superfície de Pb66; **6)** Extrato proteico citosólico de Pb8334; **7)** Extrato proteico de superfície de Pb8334; **8)** Extrato proteico de superfície de Pb18. **MW:** Peso Molecular Precision Plus Standards Dual Color BIORAD.

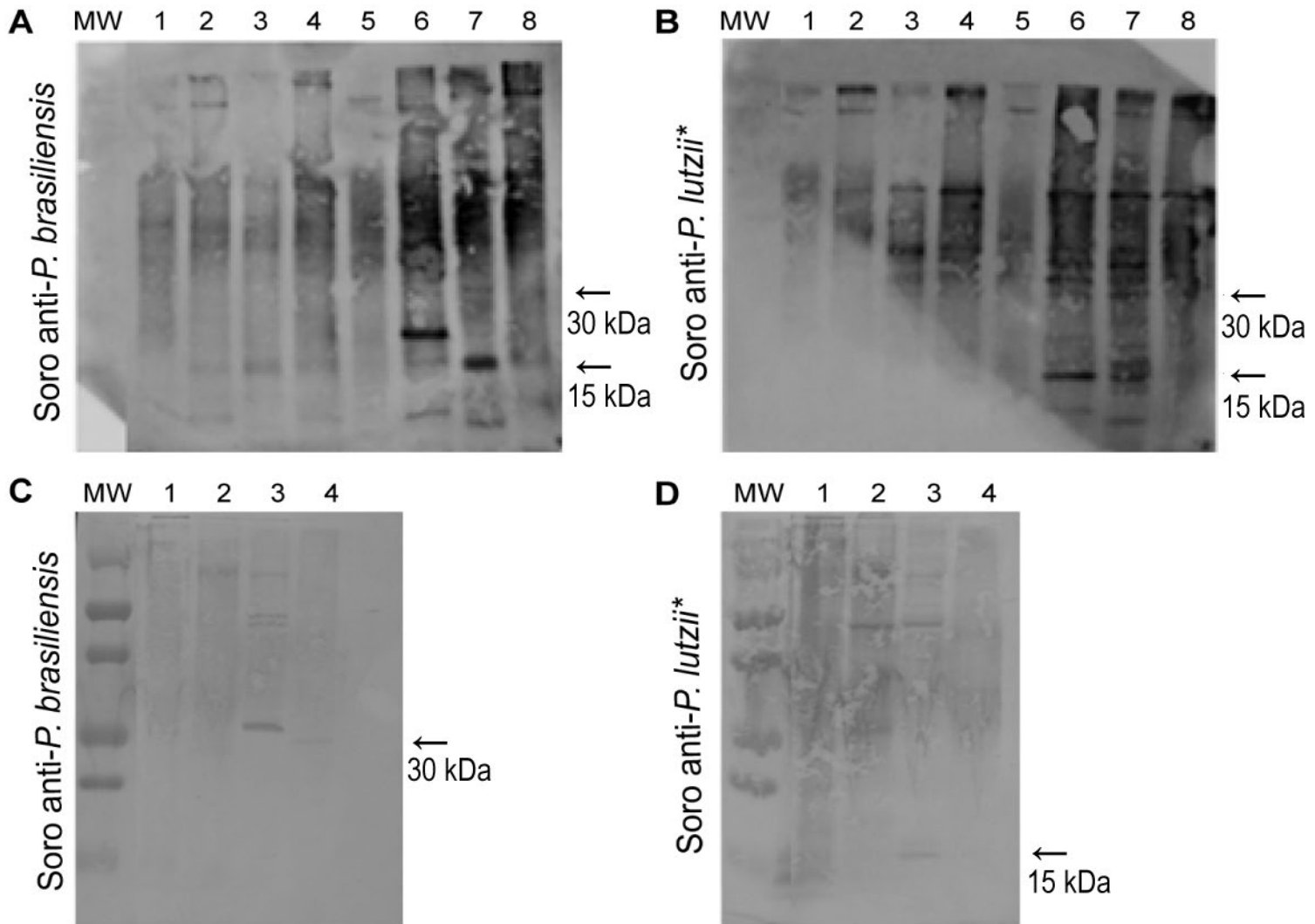


Figura 5. Detecção de proteínas com soros obtidos de pacientes diagnosticados com PCM por Western Blot.

Diferentes perfis foram obtidos após detecção de extratos proteicos de leveduras de *Paracoccidioides* spp.. Bandas com aproximadamente 15 e 30 KDas foram selecionadas por testes de Western Blot e extraídas após SDS-PAGE para análise Proteômica. **Quadros A e C:** Detecção com soro de pacientes com PCM devido à *P. brasiliensis*; **Quadros B e D:** Detecção com soro de pacientes com PCM devido à *P. lutzii* (*sorologia negativa para GP43). **1)** Extrato proteico citosólico de Pb18; **2)** Extrato proteico de superfície de Pb18; **3)** Extrato proteico citosólico de Pb01; **4)** Extrato proteico de superfície de Pb01; **5)** Extrato proteico citosólico de Pb66; **6)** Extrato proteico de superfície de Pb66; **7)** Extrato proteico citosólico de Pb8334; **8)** Extrato proteico de superfície de Pb8334. **MW (A e B):** Peso Molecular Precision Plus Standards Dual Color BIORAD. **MW (C e D):** Broad Range Protein Molecular Weight Marker Prestained Promega.

4.3.2. Proteômica como ferramenta na busca por candidatos vacinais em potencial

Análise por Espectrometria de Massa (MS) resultou na obtenção de 316 proteínas de *P. lutzii* e 164 proteínas de *P. brasiliensis*, com tamanhos que variaram de 10 a 40 kDa. A imprecisão da extração de bandas provenientes de gel 1D pode justificar essa abrangência. Tabelas no Anexo I mostram a identificação das proteínas. Após processamento utilizando o software MaxQuant, a identificação foi realizada utilizando o banco de dados Uniprot. Foram obtidos os dados relativos ao número de peptídeos observáveis (peptídeos teóricos), ao número de aminoácidos de cada sequência peptídica, às massas moleculares, às intensidades detectadas por íons, aos valores de iBAQ, e à porcentagem em massa.

A proteína Histona H2B (funções estrutural e reguladora) e uma Proteína carreadora de ADP/ATP (função de transporte) foram identificadas como macromoléculas bastante enriquecidas na superfície celular dos isolados Pb01 e Pb18. A abundância das proteínas (Figura 6) foi inferida com base na relação de proporcionalidade linear com o pico de intensidade quantificado em resposta ao sinal iônico dos peptídeos. A abundância da H2B foi bem mais expressiva nas frações analisadas a partir de leveduras de Pb01 quando comparada à abundância encontrada para Pb18. As intensidades foram convertidas em valores proporcionais à abundância molar das proteínas utilizando o algoritmo de iBAQ, a quantificação é demonstrada por mapa de calor (Figura 7 e Figura 8). A massa proteica relativa foi obtida pela normalização dos valores de iBAQ pelo valor total das massas moleculares.

Devido à localização e o enriquecimento na camada fúngica mais externa, as sequências de genes para as proteínas H2B e Carreadora de ADP/ATP são possíveis alvos terapêuticos. Estudos de imunogenicidade para validação das moléculas identificadas foram iniciados durante o doutorado com a construção de vetores de expressão para vacina de DNA e para proteína recombinante (Anexo II).

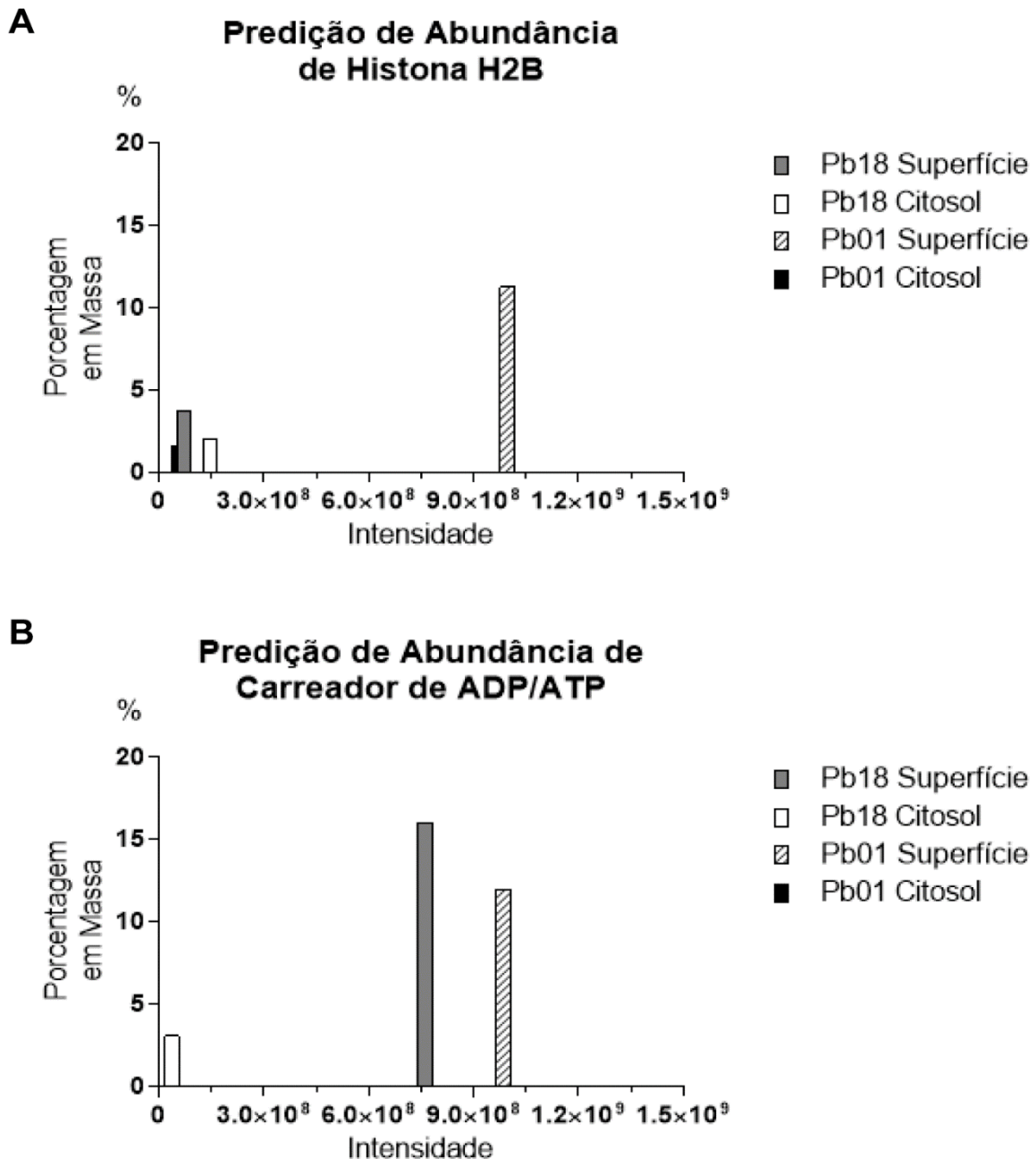


Figura 6. Relação entre Porcentagem em Massa e Intensidade de proteínas extraídas de Paracoccidioides spp.

Análise proteômica de frações de 15 e 30 KDa após extração de bandas em gel de poliacrilamida reconhecidas por soro de pacientes com PCM. Duas proteínas foram encontradas por ter uma alta abundância na superfície celular quando comparadas às demais proteínas encontradas nas frações analisadas. **(A)** Histona H2B **(B)** Proteína carreadora de ADP/ATP. **Eixo X:** Comparação entre as proteínas superficiais e citosólicas quanto à intensidade. **Eixo Y:** Comparação entre as proteínas superficiais e citosólicas quanto à porcentagem em massa.

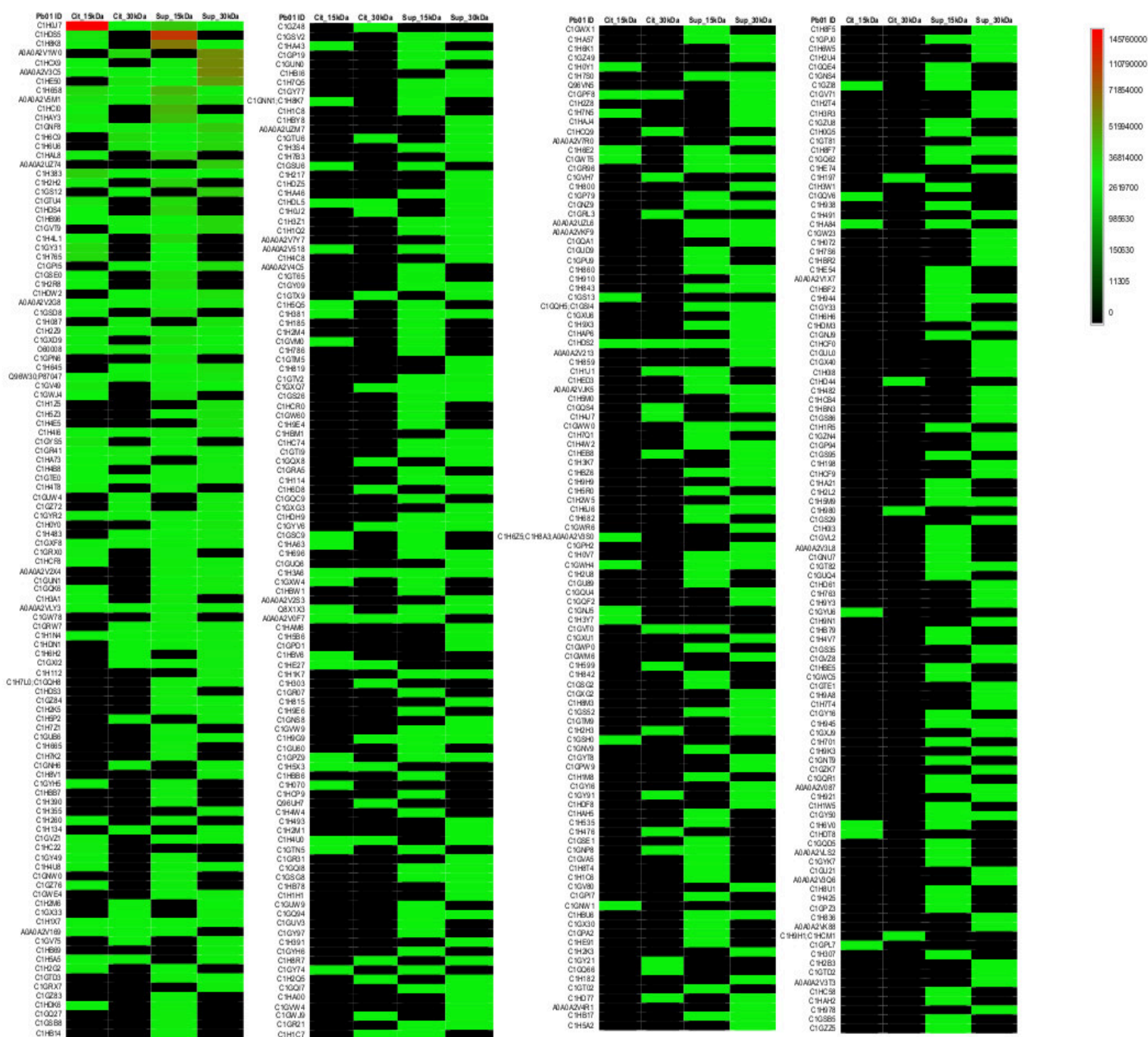


Figura 7. Mapa de calor baseado nos valores de iBAQ obtidos pela análise das proteínas encontradas nas frações de 15 e 30 kDa extraídas de leveduras de Pb01.

As identidades das proteínas foram dadas por análise FASTA em bando de dados Uniprot. As colunas representam as médias dos valores de iBAQ dos peptídeos com maior pico de intensidade. Da esquerda para direita – Coluna 1: Fração citosólica de 15 kDa; Coluna 2: Fração citosólica de 30 kDa; Coluna 3: Fração superficial de 15 kDa; Coluna 4: Fração superficial de 30 kDa. **ID 2 (C1HDS5 - Histona H2B):** Soma = 117300000; **ID 5 (C1HCX9 – Proteína Carreadora de ADP/ATP):** Soma = 65784000.

Os valores de iBAQ foram correlacionados com uma escala de cores - Quadrante direito superior.

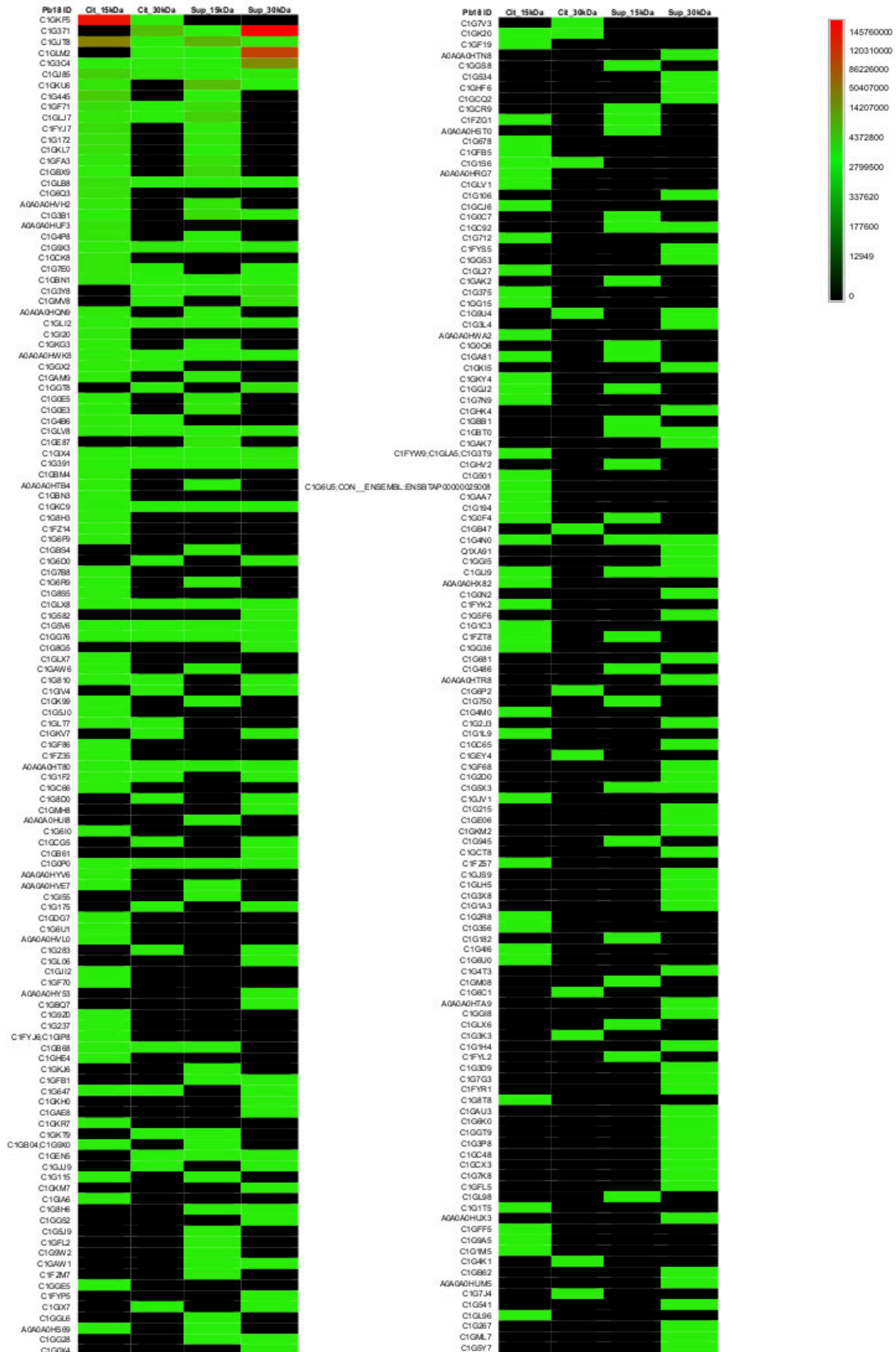


Figura 8. Mapa de calor baseado nos valores de iBAQ obtidos pela análise das proteínas encontradas nas frações de 15 e 30 kDa extraídas de leveduras de Pb18.

As identidades das proteínas foram dadas por análise FASTA em bando de dados Uniprot. As colunas representam as médias dos valores de iBAQ dos peptídeos com maior pico de intensidade. Da esquerda para direita – Coluna 1: Fração citosólica de 15 kDa; Coluna 2: Fração citosólica de 30 kDa; Coluna 3: Fração superficial de 15 kDa; Coluna 4: Fração superficial de 30 kDa. **ID 5 (C1G3C4 - Proteína Carreadora de ADP/ATP):** Soma = 53282000; **ID 9 (C1GF71 – Histona H2B):** Soma = 24416000. Os valores de iBAQ foram correlacionados com uma escala de cores - Quadrante direito superior.

4.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A fim de avaliar novas ferramentas terapêuticas no tratamento de Histoplasmose e Paracoccidioidomicose, foi feito um rastreamento de diferentes antígenos quanto ao seu potencial imunogênico. A capacidade de estimular uma resposta imune define a imunogenicidade de uma molécula, as macromoléculas mais amplamente investigadas quanto a capacidade antigênica são as proteínas e os polissacarídeos (NISHAT; ANDREANA, 2016), incluindo seus derivados como as glicoproteínas, nucleoproteínas, lipoproteínas, os peptidoglicanos e glicolípideos. Ácidos nucleicos também são compostos antigênicos, apesar da baixa imunogenicidade (HU et al., 2014).

Nesse trabalho as moléculas extraídas de células fúngicas e analisadas quanto à reatividade com anticorpos foram glicoproteínas, glicolípideos e proteínas. A afinidade com anticorpos e a complexidade estrutural foram alguns dos fatores determinantes para escolha das proteínas como antígenos no estudo de terapias baseadas em manipulação genética. A evolução das proteínas foi acompanhada e melhor estabelecida por estudos imunológicos. O entendimento sobre a importância dos lipídeos no campo da imunologia é mais recente devido a particularidades químicas e propriedades físicas limitantes, mas dados têm mostrado seu papel crítico no sistema imune (DOWDS et al., 2014). Todas as proteínas apresentam um grau de imunogenicidade associado à sua estrutura e aos determinantes antigênicos, que correspondem a domínios localizados preferencialmente nas regiões mais superficiais. Da mesma forma, a localização de antígenos na superfície mais externa da célula fúngica os predispõe a interações mais fáceis com agentes terapêuticos.

No t3pico de pesquisa desse projeto que envolve triagem e valida33o de alvos terap3euticos extra3idos de *Paracoccidioides* spp., fra33es proteicas que apresentaram reatividade contra soros policlonais contendo anticorpos contra agentes causadores da PCM foram analisadas quanto 3 prote3mica por Espectrometria de Massa. As an3lises resultaram em centenas de prote3nas das quais aquelas com maior porcentagem em massa e mais enriquecidas na superf3cie foram selecionadas. A prote3mica 3 usada para quantificar a abund3ncia, modifica33es e intera33es entre pept3deos. A quantifica33o de prote3nas foi revolucionada por m3todos baseados em MS, os quais foram adaptados para an3lises de alto rendimento de milhares de prote3nas em c3lulas ou fluidos (HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017). A compreens3o abrangente de infec33es f3ngicas humanas requer a interpreta33o da complexidade molecular e suas varia33es em m3ltiplos n3veis, nos quais se enquadram o genoma e o proteoma. Com o advento da tecnologia do sequenciamento, a biologia tem se tornado cada vez mais dependente de dados gerados nesses n3veis (SUBRAMANIAN et al., 2020). A metabol3mica busca identificar e quantificar metab3litos em larga escala, que podem ser regulados de forma din3mica por diversos fatores (KHAN et al., 2019). No caso de testes *in vitro*, como os realizados nesse estudo, os meios de cultivo f3ngico e as solu33es tamp3o para extra33o podem condicionar a express3o das macromol3culas.

Al3m da acessibilidade ao ant3geno na c3lula f3ngica, tamb3m foi levada em considera33o a relev3ncia funcional das mol3culas identificadas. Uma das mol3culas que apresentaram grande abund3ncia na superf3cie das leveduras foi a Histona H2B, prote3na conservada e componente estrutural da cromatina de c3lulas eucari3ticas (LUGER, 2003). Os resultados anal3ticos tamb3m demonstraram maior intensidade do d3mero nas fra33es extra3idas do isolado Pb01 quando comparada 3s fra33es de Pb18. A cromatina 3 altamente din3mica (VAQUERO; LOYOLA; REINBERG, 2003), modifica33es p3s-traducionais nas suas prote3nas constituintes levam a consequ3ncias estruturais e funcionais (TURNER, 2007), influenciam significativamente a transcri33o g3nica em leveduras (STEINFELD; SHAMIR; KUPIEC, 2007), e regulam processos que envolvem as vias metab3licas e a diferencia33o celular. Um conhecimento aprimorado das modifica33es de histonas nucleares dos fungos, dentre elas a acetila33o, a metila33o, ubiquitina33o, sumoila33o e a fosforila33o (TRIBUS et al., 2010), podem auxiliar na otimiza33o e no

desenvolvimento de compostos farmacêuticos para o tratamento de infecções fúngicas (BROSCH; LOIDL; GRAESSLE, 2008).

A antigenicidade da Histona foi previamente descrita por Nosanchuk e colaboradores, a partir da produção de MAb do subtipo IgM contra a proteína H2B pela imunização de camundongos com leveduras de *H. capsulatum* G217B mortas por calor. Imuno-histoquímica de tecido pulmonar infectado mostrou que o MAb reagiu com a parede celular das leveduras, estabelecendo que o antígeno é expresso durante a infecção murina. Microscopia eletrônica de transmissão com marcação por Imunogold também confirmou a localização do antígeno na superfície celular. A identidade da proteína foi obtida por MS e confirmada pela reatividade do MAb com Histona H2B recombinante sintetizada a partir da sequência de aminoácidos encontrada (NOSANCHUK et al., 2003).

Outra molécula abundante e com alta porcentagem em massa em frações obtidas de extratos de proteínas de superfície foi um Carreador de ADP/ATP. Os transportadores mitocondriais são uma superfamília de proteínas localizadas principalmente na membrana mitocondrial interna e transportam numerosos metabólitos, nucleotídeos, cofatores e ânions inorgânicos. Com o sequenciamento do genoma de *S. cerevisiae* em 1996, foi possível verificar a existência de 35 genes codantes para esses transportadores e elucidar suas funções. Dentre os processos nos quais esses carreadores estão envolvidos encontram-se a gluconeogênese, síntese de aminoácidos, replicação e transcrição gênica, tradução e modificações pós traducionais de proteínas (PALMIERI; MONNÉ, 2016). Os carreadores de ADP/ATP de leveduras consistem em seis hélices α -transmembranares (H1-H6), uma região N-terminal com sequência significativamente maior quando comparada aos ortólogos em mamíferos, e uma região C-terminal completamente conhecida quanto aos seus resíduos (RUPRECHT et al., 2014). Consideradas proteínas essenciais, possuindo regiões não homólogas aos carreadores de mesma função encontradas no hospedeiro, e tendo sua estrutura resolvida, essas moléculas se apresentam como bons candidatos terapêuticos.

A tecnologia de imunização genética consiste na introdução de ácido nucleico em células hospedeiras, onde ocorre o direcionamento e síntese dos polipeptídeos codificados (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; LOEHR; BABIUK, 2001). A

vacinação com DNA plasmidial oferece uma nova abordagem à imunoprofilaxia (VANNIASINKAM; REDDY; ERTL, 2006) e tem sido amplamente utilizada na indução de respostas imunológicas humoral e celular em modelos experimentais (LUO et al., 2006). A imunização baseada em DNA exibe vantagens importantes sobre as estratégias de imunização convencionais, possuindo custos menores de produção, sendo altamente específica e predispondo o imunógeno exposto a modificações pós traducionais no hospedeiro (FLINGAI et al., 2013).

As sequências gênicas das moléculas de Histona H2B e do Carreador de ADP/ATP obtidas a partir das sequências de aminoácidos gerada com os dados de proteômica foram utilizadas na construção de plasmídeos com o objetivo de induzir a produção de anticorpos em camundongos (Anexo II). Uma importante desvantagem das vacinas de DNA é sua baixa imunogenicidade (KUTZLER et al., 2005), por esse motivo, conforme estabelecido em outros trabalhos, foram utilizadas algumas técnicas de otimização como a adição da sequência Kozak adjacente ao códon iniciador para melhorar a eficiência de tradução (KOZAK, 1987) e de uma sequência sinal de IgE para aumentar a imunogenicidade (KUTZLER et al., 2005; YAN et al., 2011). Além disso, a entrega dos plasmídeos foi feita via eletroporação *in vivo* (EP), técnica que aumenta a permeabilidade celular devido à formação de poros transitórios nas membranas plasmáticas (TROLLET et al., 2006; CUKJATI et al., 2007), e promove reação inflamatória local (BABIUK et al., 2004). A via de imunização foi intramuscular, no quadríceps da perna traseira do animal, considerada a mais eficaz na indução de uma resposta Th₁ (HASSON; AL-BUSAIDI; SALLAM, 2015). Por último, o vetor esqueleto utilizado para clonagem possui o forte promotor SV40. Apesar das otimizações utilizadas na construção dos vetores, as vacinas de DNA podem ter induzido uma baixa expressão dos antígenos escolhidos sendo incapazes de gerar uma resposta humoral satisfatória no tempo de estímulo, o que poderia ser melhorado com o aumento no número de imunizações.

4.5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Polipeptídeos sintéticos têm sido amplamente utilizados em pesquisas imunológicas, a partir de sua estrutura é possível, por exemplo, construir diferentes antígenos a fim de elucidar a base molecular da antigenicidade. Os vetores construídos nesse trabalho, para estudo dos antígenos Histona H2B e proteína carreadora de ADP/ATP, e testados como vacina de DNA, não estimularam a produção de anticorpos detectáveis após imunização de camundongos. Os plasmídeos foram então digeridos e as sequências alvo subclonadas em vetor de expressão pET para síntese das proteínas heterólogas em *E. coli*. O tamanho da sequência do gene para H2B (15 kDa) dificultou a subclonagem. A sequência para o Carreador de ADP/ATP foi clonada com sucesso no vetor pET28a, o qual foi transformado em *E. coli* DH5-alpha (Sistema de Clonagem) e subsequentemente em *E. coli* BL21DE3 (Sistema de Expressão). A proteína heteróloga foi detectada em corpo de inclusão após purificação por cromatografia de afinidade. Os próximos passos serão a otimização de expressão e purificação, e a inoculação do imunógeno em animais para estímulo da produção de anticorpos. Caso os testes com o soro policlonal sejam promissores, células B serão utilizadas para gerar hibridomas produtoras de anticorpo monoclonal.

5. CAPÍTULO II: Quimerização de Anticorpo Monoclonal contra HSP60 de *Histoplasma capsulatum*

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 5.1.1.** Amplificar a Região Variável do Anticorpo Monoclonal contra HSP60 de *H. capsulatum* a partir de RNA extraído do hibridoma produtor do MAb 4E12;
- 5.1.2.** Clonar os insertos de cadeia leve e pesada em vetores contendo sequências para Região Constante de anticorpo IgG humano;
- 5.1.3.** Expressar Anticorpo Quimérico anti-HSP60 em células HEK 293 por método de transfecção;

5.1.4. Purificar e testar Quimera quanto à afinidade e eficácia *in vitro* e *in vivo*.

5.2. METODOLOGIA

5.2.1. Isolados

Foram utilizados os isolados *P. brasiliensis* (Pb18), *P. lutzii* (Pb01), e *H. capsulatum* (G217B).

5.2.2. Condições de cultivo

G217B foi cultivado em Caldo BHI suplementado com cisteína 0,1% e glicose 1% sob agitação de 180 rpm, à 37°C, por 3 dias. O cultivo de Pb01 e o protocolo para obtenção de massa fúngica foram descritos na subseção 4.2.2.

5.2.3. Sistema de Ligação

O plasmídeo pET21a clonado com a sequência gênica para hsp60 proveniente do fungo *H. capsulatum var. capsulatum* foi gentilmente cedido pelo Prof. George Deepe, Universidade de Cincinnati, Cincinnati, OH, EUA, ao Prof. Joshua Daniel Nosanchuk, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, EUA.

5.2.4. Transformação com construção de DNA recombinante

Um mix contendo 1 μ L do sistema de ligação (pET21a:hsp60) e 50 μ L de células *E. coli* BL21 DE3 (estirpe termocompetente para expressão heteróloga) foi incubado por 30 minutos no gelo, seguido por choque térmico a 45°C por 30 segundos. Após 2 minutos no gelo, as células foram acrescidas de 1 mL de caldo LB e incubadas sob agitação à 37°C por 1 hora. Os transformantes foram plaqueados em meio LB ágar com ampicilina 100 μ g/mL.

5.2.5. Expressão da HSP60 recombinante de *H. capsulatum*

Pré-inóculos com diferentes colônias de *E. coli* transformadas (inserto clonado com cDNA codante para HSP60 de G217B) foram preparados na noite anterior ao experimento e incubados sob agitação a 250 rpm, 37°C. Após 16 h, volumes de 12,5 mL de cada pré-inóculo foram utilizados para o preparo de inóculos com volume total de 250 mL. As culturas, preparadas em caldo LB (DIFCO/EUA) suplementados com ampicilina (100 μ g/mL) (Sigma, St. Louis/MO), foram incubadas sob agitação a 250 rpm, 37°C, até atingirem a densidade óptica (DO) de 0,6-0,8. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 Thermo Scientific) em comprimento de onda de 600 nm.

Atendida a absorbância desejada, foi acrescentado IPTG 1 mM (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific, Massachusetts/EUA), composto que mimetiza um metabólito capaz de desencadear a transcrição de genes sob controle do operon lac. A indução foi feita durante 6h, com coletas de 1mL por hora. As alíquotas foram centrifugadas por 2 minutos, a 10.000 rpm, e os pellets ressuspensos em 25 μ l de tampão de amostra. Após tempo de indução os inóculos foram centrifugados a 8000 rpm por 30 minutos, a 4°C. O pellet foi ressuspense em PBS1X, com imidazol 10 mM (Sigma - Merck Millipore/USA), e a lise feita em disruptor de células ultrasônico utilizando como parâmetros: pulsos de 10 seg, intervalos de 59 seg, e amplitude de 60%. Amostras de sobrenadante com as proteínas solúveis expressas, e as amostras de diferentes tempos de indução, foram fervidas por cinco minutos e aplicadas em géis de poliacrilamida a 12% sob condições redutoras para eletroforese. Os géis foram

corados com Coomassie Blue. Os clones escolhidos foram estocados a -80°C em glicerol 50%.

5.2.6. Purificação da proteína recombinante

Após indução à partir do clone com melhor resultado para expressão proteica, o lisado foi aplicado em coluna empacotada com níquel (Ni Sepharose High Performance – GE Healthcare, Sigma/USA) para purificação, por cromatografia de afinidade, da proteína recombinante com cauda de histidina. Após etapa de ligação e coleta de *Flow Through* (FT), foram feitas lavagens com 3 volumes de coluna de tampão fosfato-salino, imidazol 10mM. As eluições foram feitas por etapas, em tampão PO4 20mM/ NaCl 500mM, pH 8,0, com as concentrações crescentes de imidazol, 100mM, 250mM, e 500mM. O pico de eluição com máxima concentração de proteína pura foi inferido por reação colorimétrica utilizando solução de Bradford 1X. A mensuração da concentração proteica foi feita em Nanoespectrofotômetro, à 280nm.

5.2.7. Extração e Quantificação de Proteínas provenientes de *Paracoccidioides* spp. e *H. capsulatum*

O procedimento foi realizado conforme indicado na subseção 4.2.6.1.

5.2.8. Análise eletroforética de proteínas

As amostras com os extratos proteicos (1,5 mg/mL por poço) ou HSP60 purificada (0,5 mg/mL) foram aplicadas em gel de poliacrilamida. A eletroforese foi

feita sob condições redutoras. As bandas foram reveladas com Comassie Blue 250R 0,1%.

5.2.9. Soros de pacientes

Soros coletados de pacientes diagnosticados com PCM ou de pacientes diagnosticados com Histoplasmosose foram obtidos na soroteca do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. O projeto possui autorização do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (CEP-HCFMUSP), protocolo 4.080.545.

5.2.10. Descongelamento e manutenção do clone produtor do Anticorpo Monoclonal (MAb) contra HSP60

Alíquotas do hibridoma produtor de MAb contra HSP60 (clone 4E12) de *H. capsulatum*, isolado G217B, produzido anteriormente no laboratório do Prof. Joshua Nosanchuk (GUIMARÃES et al., 2009), foram mantidos em estoque à -80°C. As células foram descongeladas rapidamente em banho maria à 37°C e lavadas com meio RPMI (Corning Cellgro/USA) para eliminar qualquer vestígio de DMSO (Sigma Aldrich - Atena Biotecnologia, Campinas/SP). O sedimento foi ressuspensão em RPMI 1640/Glutamina/NaHCO₃ suplementado (SFB 10%, HEPES 25 mM, MEM Amino Acids 1X, e Piruvato de sódio 1X) e as células mantidas à 37°C/ CO₂ 5%, com trocas de meio a cada 2 dias e repiques ou expansões conforme confluência.

5.2.11. Verificação de estabilidade genética do MAb

O sobrenadante de cultura foi coletado, durante a etapa de expansão e manutenção das células de hibridoma, e estocado a 4°C. As amostras foram

agrupadas, concentradas em AMICON contendo disco de ultrafiltração com membrana de 100 kDa (Merck Millipore/USA), e analisadas quanto à estabilidade genética segundo os testes abaixo:

5.2.11.1. Confirmação do isotipo

A confirmação do isotipo, previamente identificado por Guimarães e colaboradores (2009), foi feita por ELISA sanduíche. A placa foi sensibilizada com anticorpo de captura, anti IgG total de camundongo não conjugado, durante a noite a 4°C. A placa foi bloqueada com PBS1X BSA 3%. A amostra concentrada de MAb contra HSP60 foi adicionada à placa. A detecção do isotipo foi feita por incubação com anticorpos contra IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, conjugados com fosfatase alcalina. A placa foi rapidamente lavada com Tampão de Fosfatase Alcalina (APB), solução contendo NaCl 0,1M, MgCl₂ 50 mM, e Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, e revelada com solução 1:1 de NBT/BCIP (Nitroazul de tetrazólio/5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato). Todas as incubações seguidas à sensibilização foram feitas a 1h/37°C, e intercaladas por 3 lavagens de 5 minutos com PBS1X Tween 20 0,05%.

5.2.11.2. Mensuração da concentração do MAb

Após isotipagem, o anticorpo IgG detectado (IgG2a) serviu como padrão para curva de concentração, as diluições foram feitas a partir da concentração de 10µg/mL. O sobrenadante de cultura foi diluído a partir da proporção 1:100. Ambas as diluições foram feitas na razão de 3. A detecção foi feita com anticorpo secundário anti IgG conjugada a fosfatase alcalina (1:2500). Lavagens e revelação foram feitas conforme descrito acima (Subsessão 4.2.11.1).

5.2.11.3. Análise de afinidade pela reação antígeno-anticorpo

A análise foi feita por ELISA indireto. A placa de 96 poços foi sensibilizada com a proteína HSP60 (10µg), durante a noite a 4°C. A placa contendo o antígeno aderido foi incubada em solução de bloqueio (PBS1X BSA 3%). O MAb 4E12 (10µg/mL) foi utilizado como anticorpo primário, para detecção foi utilizado o anticorpo secundário contra IgG2a de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (1:2500). Lavagens e revelação foram feitas conforme descrito acima (Subsessão 4.2.11.1).

5.2.12. Extração de RNA de células de hibridoma

Hibridomas foram contados em hemocítômetro para preparo de suspensão contendo 3×10^6 células. Após centrifugação a 200xg/5 min, o sedimento foi ressuspenso em tampão de lise e a disrupção feita em vórtex por 15 segundos. O lisado foi passado 10 vezes através de agulha de calibre 25 com seringa, para quebrar o DNA genômico, adicionada de etanol 100%, e agitada vigorosamente (vortex) por mais 10 segundos.

Uma mini coluna, com resina como matrix de separação e acoplada a um tubo de coleta (EXIQON), foi carregada com o lisado em etanol e centrifugada por 1 min/3500xg. Foram feitas 3 centrifugações por 1min/14000xg com tampão de lavagem, seguidas de uma centrifugação adicional sem tampão para secar a resina. A coluna foi transferida do tubo de coleta para um tubo tipo eppendorf, e o RNA foi eluído com 50 µL de tampão de eluição, por centrifugações consecutivas a 200xg/2min e a 14000xg/1min. As amostras de RNA foram estocadas a -80°C (Volumes conforme Kit miRCURY RNA Isolation Kit – Cell & Plant, EXIQON/USA).

5.2.13. Construção de iniciadores para amplificação

Os iniciadores foram construídos com base no banco de dados de Kabat (KABAT, 1991), e tendo como referência o trabalho de Nicholls e colaboradores, 1993 (NICHOLLS et al., 1993). Kabat identificou os resíduos de aminoácidos que constituem as CDR s com base na alta variabilidade quando comparado a outras regiões do anticorpo (KABAT; WU; BILOFSKY, 1976). Os iniciadores 5' universais (degenerados), ou os conjuntos de iniciadores 5', são correspondentes a todos os genes de cadeia variável existentes em camundongo. Os *overhangs* adicionados são complementares à sequência, com no mínimo 30 pares de bases, para pareamento em frame com os sítios de clonagem do vetor de expressão pMAZ e à jusante da porção Fc.

5.2.14. Amplificação de sequências das cadeias variáveis

As amplificações reversas das sequências de RNA foram feitas segundo as especificações do Kit de Síntese de cDNA iScript (Bio-Rad/USA), a partir do template extraído. Os templates de DNA foram então utilizados para amplificação das sequências das regiões variáveis por PCR. As especificações para preparo das amostras, e os parâmetros para os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, foram seguidas conforme o Kit *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Scientific/USA).

5.2.15. Purificação de fragmento de DNA

Após análise das amostras amplificadas, por eletroforese à 80V em gel de agarose 1%, fragmentos de DNA com o tamanho esperado de aproximadamente 400 bps foram extraídos, processados, e purificados, conforme protocolo do Kit de Extração para Gel (QIAquick/USA).

5.2.16. Preparo de vetor linearizado

Os vetores de expressão em células de mamífero, pMAZ-VH e pMAZ-VL (MAZOR et al., 2007), foram gentilmente cedidos pelo laboratório do Dr. J. Lai, Price Building, Albert Einstein College of Medicine. A linearização foi feita (600 ng de DNA), em tampão NEB 2.1 ou NEB 3.1, por digestão enzimática nos sítios de inserção, com BssHII e NheI, no plasmídeo para cadeia pesada (Hc – Heavy chain), e com BssHII e BsiWI no plasmídeo para cadeia leve (Lc – Light chain) (0,5 µL de cada enzima). A eletroforese foi feita em gel de agarose 1% preparado com tampão TBE 1X acrescido de Brometo de Etídeo 0,5 µg/mL. Os fragmentos para clonagem foram extraídos e purificados conforme subseção 4.2.15.

5.2.17. Clonagem em vetor de expressão

Após determinar a concentração das amostras de DNA, por espectrofotometria no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific/USA) a 260nm, um total de 0,5 pmols de um mix dos fragmentos de região variável (Vr) e de vetores linearizados (2:1) foi adicionado a 10 µL de *Gibson Assembly Master Mix* e incubado a 50°C por 1 hora. Os vetores clonados foram transformados em *E. coli* DH5 alpha conforme subseção 4.1.12.

5.2.18. Sequenciamento e seleção de clones

Diferentes colônias de cada transformante foram coletadas para preparar inóculos de 5 mL. O DNA contido em cada amostra foi propagado por Mini Preparação seguindo as especificações do QIAprep Miniprep kit (QIAGEN, USA). A quantificação foi feita por espectrofotometria em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific/USA). As amostras foram preparadas conforme instruções para sequenciamento de plasmídeo por método de Sanger (pré mix de 80 ng/µL de DNA com primer universal CMV-Forward), e enviadas à empresa GENEWIZ (NJ, USA).

5.2.19. Transfecção e expressão de anticorpo quimérico

Para determinar a concentração ótima dos plasmídeos, foi realizada transfecção em pequena escala. Foram testadas 7 diferentes proporções na razão de 2. Uma solução em PBS contendo DNA plasmidial (para 500 ng/mL de volume final de cultura) e PEI (para 2 µg/mL de volume final de cultura) (Polysciences, Inc. Warrington, PA/USA) foi incubada à 25°C/ 10 min. A mistura foi gotejada em 30 mL de cultura de HEK 293 contendo 1×10^6 células/mL. Após 24 h da transfecção, foram adicionados 10 mL de meio fresco e Ácido Valproico (VPA) (Sigma-Aldrich, USA) para concentração final de 3 mM. A incubação foi feita sob agitação a 110 rpm, 37°C, CO₂ 8%, por 6 dias.

Após período de incubação, a cultura foi centrifugada a 1000xg/5 min, o sobrenadante foi coletado e purificado. A análise das frações eluídas foi feita por SDS-PAGE, em condições redutoras e não redutoras, em gel de poliacrilamida 12%. Transfecção em larga escala foi feita em 600 mL de cultura, conforme os parâmetros descritos acima adequando-se as proporções aos volumes.

5.2.20. Purificação de anticorpo quimérico

5.2.20.1. Purificação após expressão em pequena escala

Colunas descartáveis (BioRad/USA) foram empacotadas com 100 µl de resina de proteína A e preenchidas com os sobrenadantes de cultura, contendo o anticorpo expresso, previamente incubados a 110 rpm/4°C, por 1h. Após 3 lavagens com 2 mL de PBS 1X cada, o anticorpo foi eluído em 5 frações de 100 µl em tampão de eluição (ácido cítrico 0,1 M, pH 3). As frações foram coletadas em tubos contendo 10 µl de Tris 1M, pH 9,0.

5.2.20.2. Purificação após expressão em larga escala

Purificação de afinidade foi feita em equipamento ÄKTA express (GE Healthcare/USA) em coluna MabSelect SuRe (GE/USA) de 5 ml. Segunda etapa de purificação foi feita por filtração em gel (Superdex S200 26/60, GE/USA) em PBS 1X. O rendimento do anticorpo purificado foi calculado pela absorbância obtida a 280 nm.

5.2.21. Engenharia de anticorpos: Esquema para quimera construída por manipulação genética

Uma das desvantagens da terapia com anticorpos monoclonais em humanos é que esses anticorpos, produzidos pela imunização de espécies não humanas (geralmente camundongos), podem ser imunogênicos e desenvolver uma resposta imune no paciente. O processo de humanização pode diminuir a possibilidade de reações como essa, que interferem com a terapêutica e levam a reações alérgicas, podendo resultar em anafilaxia. O anticorpo quimérico aqui produzido foi gerado pela união das regiões variáveis que codificam os determinantes de reconhecimento de antígeno, obtidas a partir do gene para o anticorpo murino contra HSP60 de *H. capsulatum* (MAb 4E12), à região Fc de IgG1 humana, presente nos vetores pMAZ, por manipulação genética (Figura 9). O plasmídeo pMAZ-VH, utilizado para clonagem do inserto contendo a sequência para cadeia variável pesada, também compreende códons para cisteína. Os aminoácidos formarão pontes dissulfeto para conectar a porção Fc à porção Fab (Figura 10).

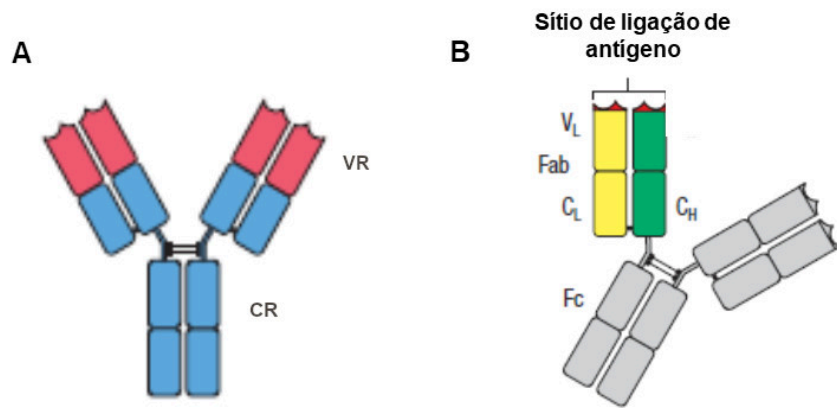


Figura 9. Estrutura básica de um anticorpo quimérico.

(A) Representação de uma quimera constituída por região murina unida à região humana. A sequência codante para região variável (Vr), representada em vermelho, foi transcrita reversamente e amplificada a partir do RNA extraído de células de hibridoma produtoras de MAb anti-HSP60. A sequência para região constante (Cr), representada em azul, foi expressa a partir de região codante presente nos vetores de clonagem pMAZ. **(B) Anticorpo dividido em frações.** Fab é a fração de ligação ao antígeno. A cadeia leve está representada em amarelo e a cadeia pesada em verde. Fc é a fração de ligação a outros componentes do sistema imunológico, disparando uma resposta contra o antígeno.

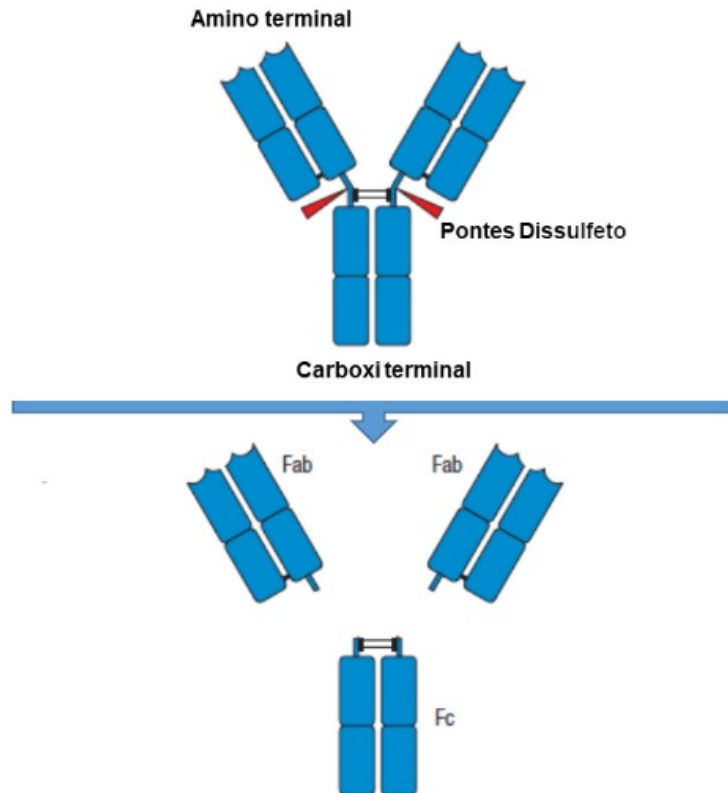


Figura 10. Os anticorpos consistem em segmentos conectados por porção flexível.

As cadeias polipeptídicas que constituem um anticorpo permanecem ligados por pontes dissulfeto (S-S), ligação entre cisteínas codificadas a partir de sequências presentes no vetor pMAZ-VH. Os domínios presentes na região amino-terminal são altamente variáveis e conferem ao anticorpo a habilidade de ligação a antígenos específicos. Na região carboxi-terminal os domínios das cadeias leves e pesadas são altamente constantes.

5.2.22. Titulação de ch-MAb 4E12

Placa de 96 poços foi sensibilizada com HSP60 recombinante na concentração de 5 µg/poço, durante a noite a 4°C. A proteína foi incubada com diluições do anticorpo quimérico a partir de 0,5 mg/mL (50 µg) na razão de 2. O anticorpo monoclonal murino 4E12 foi utilizado como controle positivo e o MAb F1.4 contra β-glucano (THOMAZ, 2012) como controle negativo, PBS foi utilizado como branco. A detecção foi feita com anticorpo secundário anti-IgG (humano ou de camundongo) conjugado a peroxidase. Revelação cromogênica foi feita com Kit TMB (BD OptEIA, USA). A leitura foi realizada em equipamento Epoch, à 450 nm, após adição de solução de parada H₂SO₄ 3M. As incubações foram feitas por 1 h/37 °C, e intercaladas por 3 lavagens com PBS 1X Tween 0,05%.

5.2.23. Detecção por Western Blot da proteína HSP60 pelo anticorpo quimérico

Amostras contendo os extratos proteicos fúngicos (Pb01, Pb18 ou G217B) e a proteína de choque térmico recombinante foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose conforme descrito na subseção 4.1.9.2. As membranas foram incubadas com anticorpo quimérico (10 ou 50 µg). O MAb 4E12 (10 µg) foi utilizado como controle positivo. Anticorpos secundários anti-IgG conjugados à peroxidase, humano ou de camundongo (BioRad – Biotika

Biotecnologia, São Paulo/Brasil), foram utilizados para detecção. A revelação foi feita com kit ECL (Sinapse Biotecnologia - GE Healthcare, São Paulo/Brasil) e leitura em Fotodocumentador (Gel Doc XR + Gel Documentation System – BioRad). O bloqueio dos sítios livres foi realizado com PBS 1X BSA 3% durante a noite, as incubações à 37°C tiveram duração de 1h e foram intercaladas por 3 lavagens (5 min cada) com PBS1X Tween 0,05%.

5.2.24. Ensaio de fagocitose

A linhagem celular monocítica humana (THP1) foi cultivada em RPMI suplementado com SFB 10% (LGC, Biotecnologia, São Paulo/Brasil) e AAS 1%, acrescido de Penicilina-Estreptomicina (Gibco - Thermo Fisher Scientific, São Paulo/Brasil). As células foram plaqueadas numa concentração de 2×10^5 /poço e diferenciadas em macrófagos com forbol 12-miristato 13-acetato, PMA 100 nM (Sigma-Aldrich, São Paulo/Brasil), durante 24 horas a 37°C/ CO₂ 5%. Células de leveduras foram inativadas por calor durante 90 min/100°C e coradas com solução de CalcoFluor 1% por 10 min/25°C, a concentração dos inóculos foi ajustada para 1×10^6 células de leveduras por poço. As células fúngicas foram opsonizadas ou não, durante a noite a 4°C, com anticorpo irrelevante, soros contra *H. capsulatum* ou contra *P. lutzii*, ou com o anticorpo quimérico contra HSP60 (5, 10 ou 50 µg). Em paralelo, os macrófagos diferenciados foram estimulados ou não com 2,5 µg/mL de IFN-gamma/poço por 16 horas/ 37°C/ CO₂ 5%.

Em seguida, os macrófagos foram incubados por 1 h com as células de leveduras opsonizadas. Após período de incubação as placas foram lavadas com solução de alpha-manopiranosídeo 0,15 M. Uma replicata de cada grupo foi fixada em metanol (Labsynth, São Paulo/Brasil) por 30 min/25°C e coradas com Giemsa (Laborclin, Pinhais/PR) diluído 20x, para coloração diferencial e contagem por microscopia de luz óptica. As duas replicatas restantes de cada grupo foram incubadas com anticorpo contra IgG humano conjugado com FITC por 60 min/37°C e coradas com marcador lisossomal, segundo as especificações do Lysosomal Staining Kit - Red Fluorescence - Cytopainter (ab112137), para detecção de fluorescência na

formação de fagolisossomas. A Capacidade Fagocítica (Número de fagócitos com leveduras internalizadas/100 macrófagos) foi analisada após 2, 4, 6 e 8 horas de co-cultivo.

5.2.25. Ensaio de Citotoxicidade

A linhagem celular THP1 foi incubada (1×10^4 células/poço) por 24h a 37°C/ CO₂ 5%, em placa de microtitulação de 96 poços, com ch-MAb 4E12 (1 µg, 5 µg, 10 µg, 50 µg ou 100 µg). O controle negativo para morte celular não recebeu tratamento. Solução MTT foi adicionada após o tempo de tratamento para uma concentração final de 0,5 mg/mL por poço. A placa foi incubada por 4 h a 37°C/ CO₂ 5%. Os cristais de formazan foram solubilizados com 50 µL de DMSO/poço (Sigma Aldrich - Atena Biotecnologia, Campinas/SP) por 30 min/ 37°C/ CO₂ 5%. A quantificação foi feita por espectrofotometria em leitor de placas Epoch a 540 nm. A viabilidade (DO grupo tratado/DO grupo controle) das células tratadas foi comparada com o grupo controle (100% de viabilidade).

5.2.26. Ensaio de toxicidade aguda em larvas de *Galleria Mellonella*

As larvas de *G. mellonella* são mantidas para crescimento e reprodução no Instituto de Ciências Biomédicas II da USP. Grupos com 16 larvas cada, pesando de 120 a 200 mg, foram inoculados com 10µL de amostras no terceiro proleg do lado direito com uma micro-seringa (Hamilton co., Reno, NV, EUA). As larvas foram tratadas com ch-MAb 4E12 (1, 5, 10, 25 e 50 µg), ou com o MAb parental 4E12 5 µg. Os controles negativos não receberam tratamento ou receberam apenas PBS1X. As larvas foram incubadas à temperatura ambiente (25°C) e avaliadas diariamente durante 7 dias, os experimentos foram realizados em duplicata. A morte foi definida como a perda total de mobilidade.

5.2.27. Ensaio para contagem de Unidades Formadoras de Colônias

A imunização foi realizada intraperitonealmente com 1, 5, 10 ou 25 µg de ch-MAb 4E12 IgG1 para *H. capsulatum var. capsulatum* Hsp60, com o MAb4E12 IgG2a parental como controle positivo, ou com um isotipo IgG de MAb irrelevante, duas horas antes da infecção intranasal. Um grupo controle não recebeu tratamento. Os anticorpos foram testados quanto à ausência de endotoxina usando os kits QCL Chromogenic LAL- Kinetic Assay para preparação de amostras - e - Endpoint Assay para leitura (Lonza, Walkersville, MD).

Os ensaios para contagem de UFC foram realizados utilizando inóculos com 5×10^6 células de levedura de *H. capsulatum var. capsulatum*. Os animais foram eutanasiados 7 dias após a infecção, os pulmões e baços foram pesados, macerados e homogeneizados separadamente em 2 mL e 1 mL de PBS, respectivamente. Os homogenatos de pulmão foram diluídos 40 e 20 vezes e semeados em ágar BHI, os homogenatos de baço foram semeados diretamente. As culturas foram incubadas a 37°C para determinar a carga fúngica. Cada grupo continha cinco camundongos e os experimentos foram realizados em duplicata. Uma solução de 100 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina foi administrada para anestesia.

5.2.28. Análise estatística

As análises dos dados de fagocitose e de citotoxicidade foram feitas com software Graph Pad Prism 7.1 por One-way ANOVA seguidas por um pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. A análise da taxa de sobrevivência para larvas de *G. mellonella* foi feita por Curva de Kaplan-Meyer.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Seleção de clones para expressão de HSP60 recombinante solúvel

Após transformação e plaqueamento de células de *E. coli* BL21 DE3 com construções contendo cDNA codante para HSP60 de *H. capsulatum* G217B, foram selecionadas 5 colônias para expressão heteróloga. Amostra coletada antes da adição de IPTG, e amostras coletadas a cada hora de indução dos clones escolhidos, foram testadas por eletroforese de proteínas. Os clones 1 e 4 mostraram melhor resultado quanto à expressão da chaperona, conforme pode ser observado com a detecção da banda no tamanho esperado de aproximadamente 60 kDa (Figura 11). Após ruptura das células e comparação entre quantidade aparente da proteína em corpo de inclusão e da proteína solúvel, o clone 4 foi escolhido para indução e purificação da HSP60 (Figura 12).

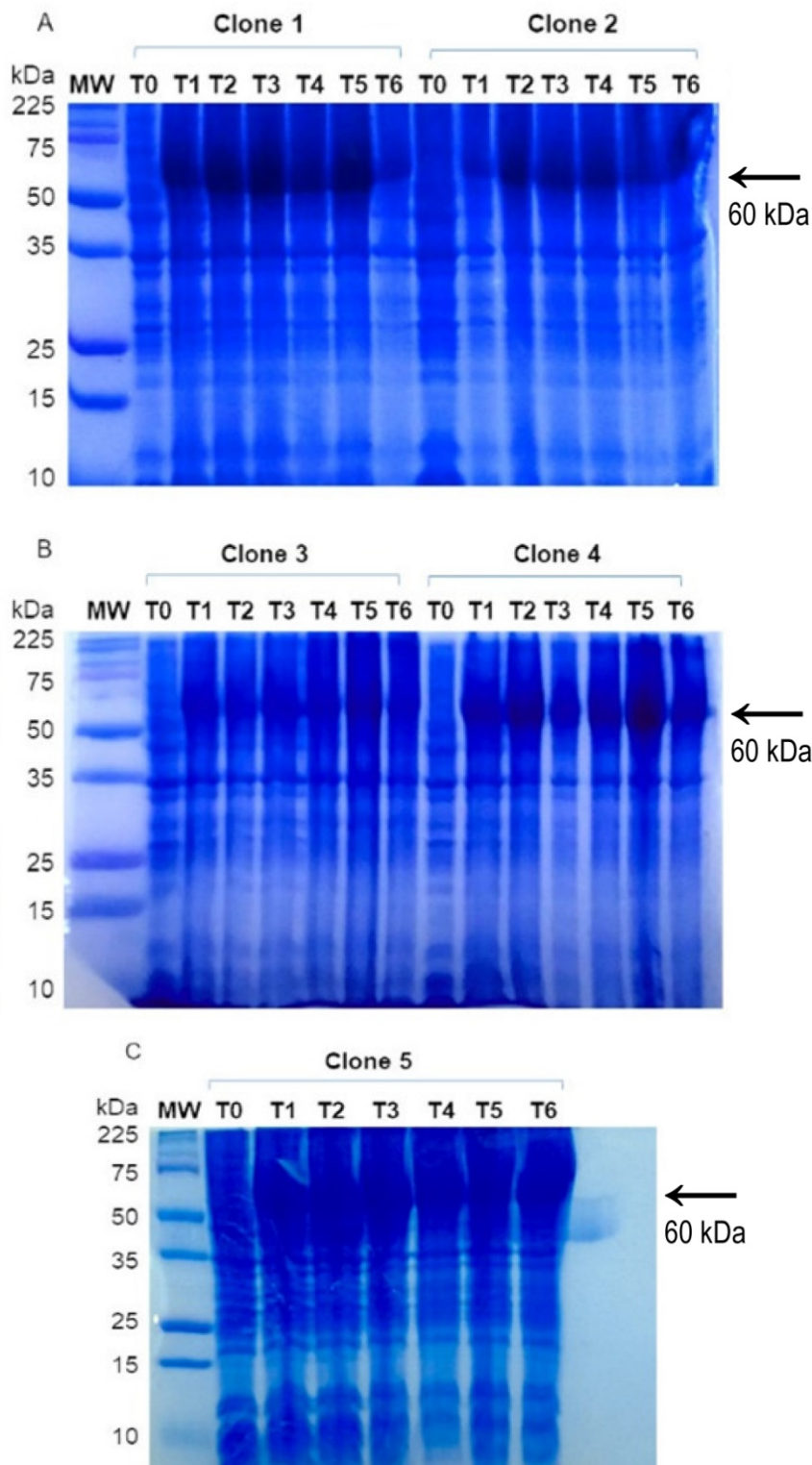


Figura 11. Expressão Heteróloga da proteína HSP60 de *H. capsulatum*.

Indução da expressão de HSP60 (sequência obtida do isolado G217B) com IPTG 1mM a partir do vetor plasmidial BL21 DE3, mostrou-se mais eficiente com os clones 1 e 4, no tempo de 5 horas. **(A)** SDS PAGE de proteínas expressas pelos clones 1 e 2 de *E. coli*. **(B)** SDS PAGE de proteínas expressas pelos clones 3 e 4 de *E. coli*. **(C)** SDS PAGE de proteínas expressas pelo clone 5 de *E. coli*. **MW:** Broad Range Protein Molecular Weight Marker Prestained Promega. **T0:** Antes da adição de IPTG; **T1:** 1h

após IPTG; **T2**: 2h após IPTG; **T3**: 3h após IPTG; **T4**: 4h após IPTG; **T5**: 5h após IPTG; **T6**: 6h após IPTG.

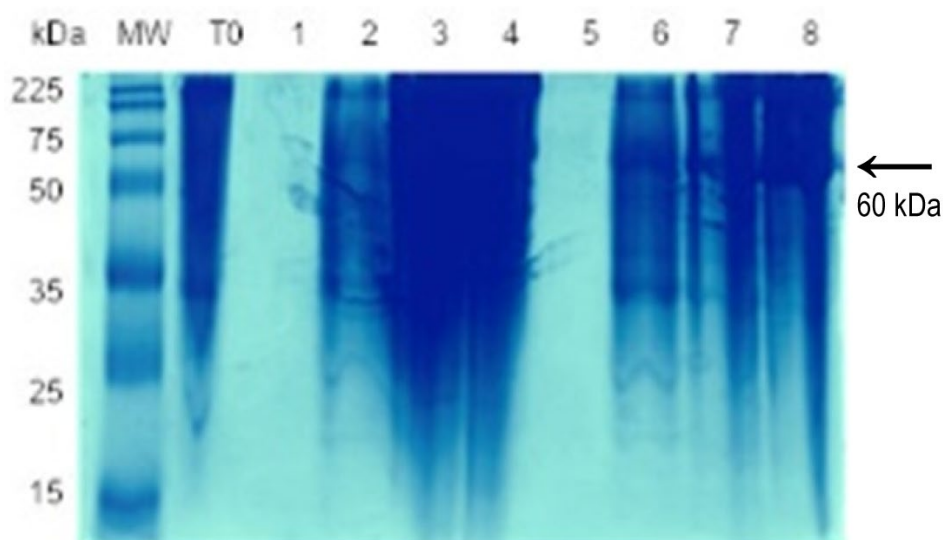


Figura 12. Comparação entre clones 1 e 4 para expressão da HSP60 solúvel.

Apesar do SDS-PAGE mostrar presença de proteínas em corpo de inclusão (poços indicados por 3, 4, 7 e 8), a expressão da HSP60 foi satisfatória (de acordo com a quantidade necessária para os testes a serem realizados) sob condições nativas, havendo liberação da proteína para o sobrenadante após procedimento de sonicação (poço 6). O clone 4 foi selecionado para prosseguir com a purificação. **Clone 1**: Poços 1-4; **Clone 4**: Poços 5-8. **MW**: Broad Range Protein Molecular Weight Marker Prestained Promega; **T0**: Tempo 0 (Antes da adição de IPTG); **(1 e 5)**: Sobrenadante de cultura antes da sonicação **(2 e 6)**: Sobrenadante de cultura após a sonicação; **(3 e 7)**: Pellet antes da sonicação. **(4 e 8)**: Pellet após a sonicação.

5.3.2. Obtenção de HSP60 pura por Cromatografia de Afinidade

O pico para obtenção da proteína HSP60 pura foi detectado na fração eluída na presença de 250 mM de imidazol (Figura 13).

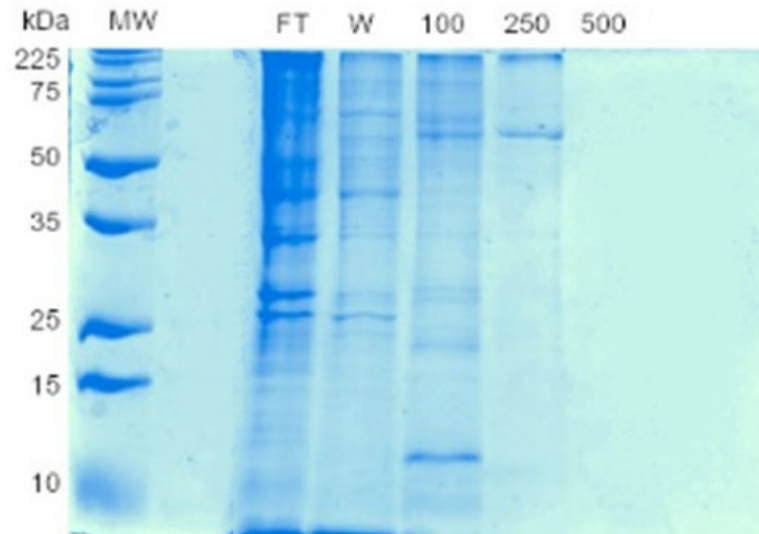


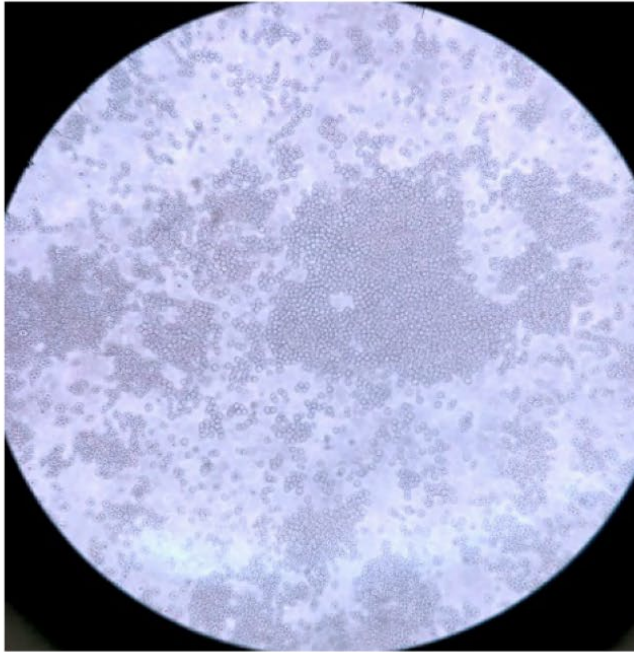
Figura 13. Análise por SDS-PAGE das frações obtidas com a purificação de HSP60 por Cromatografia de Afinidade.

A proteína heteróloga HSP60 começou a ser eluída no tampão de eluição com imidazol 100mM, a análise da fração mostrou várias bandas inespecíficas. A proteína pura foi obtida no tampão de eluição 250 mM. **MW**: Broad Range Protein Molecular Weight Marker Prestained Promega; **FT**: Flow Through; **W**: Wash (Lavagem); **100**: Eluato no tampão de eluição com imidazol 100 mM; **250**: Eluato no tampão de eluição com imidazol 250 mM; **500**: Eluato no tampão de eluição com imidazol 500 mM.

5.3.3. Estabilidade genética do anticorpo monoclonal 4E12

Os hibridomas se desenvolveram normalmente em meio e foram capazes de produzir MAb 4E12 contra HSP60 (Figura 14). O sobrenadante de cultura foi coletado durante manutenção e expansão das células, e concentrado em AMICON. A isotipagem identificou reatividade para o subtipo IgG2a, de acordo com a publicação de Guimarães e colaboradores (2009). O resultado da mensuração da concentração de 4E12, com base em curva padrão feita com anticorpo IgG2a, foi de 54 µg/mL. A eficácia de reatividade e de afinidade do MAb contra HSP60 foram testadas por ELISA (1:24300).

A



B

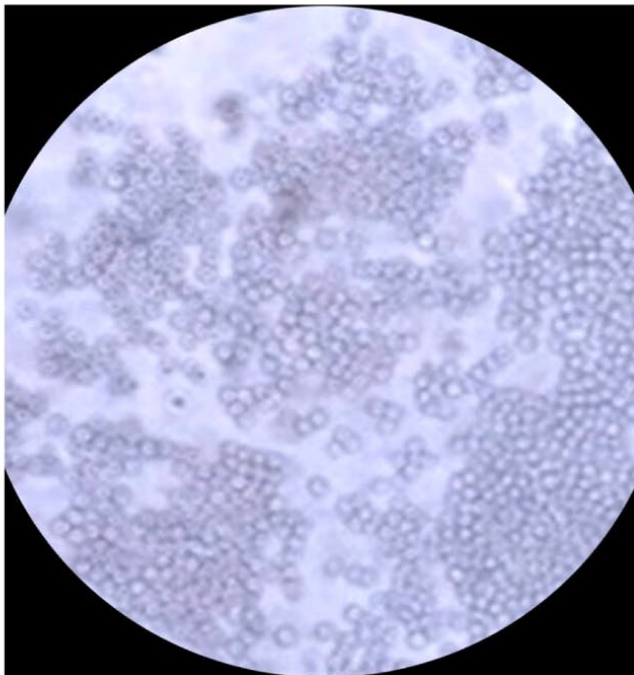


Figura 14. Células de hibridoma produtoras de MAb 4E12 analisadas por Microscopia Óptica.

A captura mostra células com morfologia saudável e confluência adequada para repique. **A)** Objetiva de 10X **B)** Objetiva de 40X

5.3.4. Quadro de prospecção para triagem de Iniciadores

O RNA extraído dos hibridomas produtores do anticorpo monoclonal contra HSP60 foi transcrito reversamente para DNA complementar por RT-qPCR utilizando o Kit Síntese de cDNA iScript (Bio-Rad). O cDNA obtido foi utilizado como template para amplificação das cadeias variáveis do MAb 4E12. Foram testados 4 pares de iniciadores senso e anti-senso para amplificação de cadeia pesada, e 6 pares para cadeia leve (Tabela 1).

Tabela 1. Iniciadores com sequências overhang para pareamento com o vetor de expressão pMaz seguidas de sequências de bases obtidas do banco de dados de Kabat.

As amplificações das cadeias pesadas e leves foram testadas com pares formados entre cada iniciador senso com o correspondente anti-senso.

		VH-I: 5'-aatgacatccactttgcctttctctccacaggcgcgactccCAGGTGCAGCTKMAGGAGTCA-3'
		VH-II: 5'-aatgacatccactttgcctttctctccacaggcgcgactccCAGGTCCARCTGCAGCAGYCT-3'
	IgH	VH-III: 5'-aatgacatccactttgcctttctctccacaggcgcgactccGARGTGAAGCTGGTGGARTCT-3'
		VH-V: 5'-aatgacatccactttgcctttctctccacaggcgcgactccGAGGTTGAGCTTCAGCAGTCT-3'
Iniciadores		VL-I/III: 5'-aatgacatccactttgcctttctctccacaggcgcgactccGACATTGTGATGACYCARTCT-3'
Senso		VL-IV/VI: 5'-aatgacatccactttgcctttctctccacaggcgcgactccCAAATGTGKCTCACCCAGTCT-3'
		VL-IIa: 5'-aatgacatccactttgcctttctctccacaggcgcgactccGATGTTKTGATGACCCAAACT-3'
	IgL	VL-IIb: 5'-aatgacatccactttgcctttctctccacaggcgcgactccGAYATTGTGATAACCCAGGMT-3'
		VL-Va: 5'-aatgacatccactttgcctttctctccacaggcgcgactccGACATCSAGATGACYCAGTCT-3'
		VL-Vb: 5'-aatgacatccactttgcctttctctccacaggcgcgactccGAYATTGTGMTGACMCAGTCT-3'
Iniciadores	IgH	CH-UNI: 5'-ccagggggaagaccgatgggcccttggtgctagcTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCCTTGRCCCA-3'
Anti- Senso	IgL	CL-UNI: 5'-gggaagatgaagacagatggtgcagccaccgtacgTTTTATCTCCAGCTTKGTSCC-3'

5.3.5. Seleção de iniciadores senso e anti-senso para amplificação das Regiões Variáveis

As seqüências das cadeias pesadas e leves das regiões variáveis do anticorpo murino, de aproximadamente 400 bps, foram amplificadas a partir do DNA complementar. Os pares de iniciadores eficazes no anelamento foram VH-II/CH-UNI e VH-V/CH-UNI, para cadeia pesada, e VL-I/III/CL-UNI, VL-IIa/CL-UNI e VL-Vb/CL-UNI, para cadeia leve. Amostras com os fragmentos de DNA foram visualizadas com luz UV após PCR (Figura 15). As bandas com o tamanho esperado foram extraídas e purificadas (Figura 16).

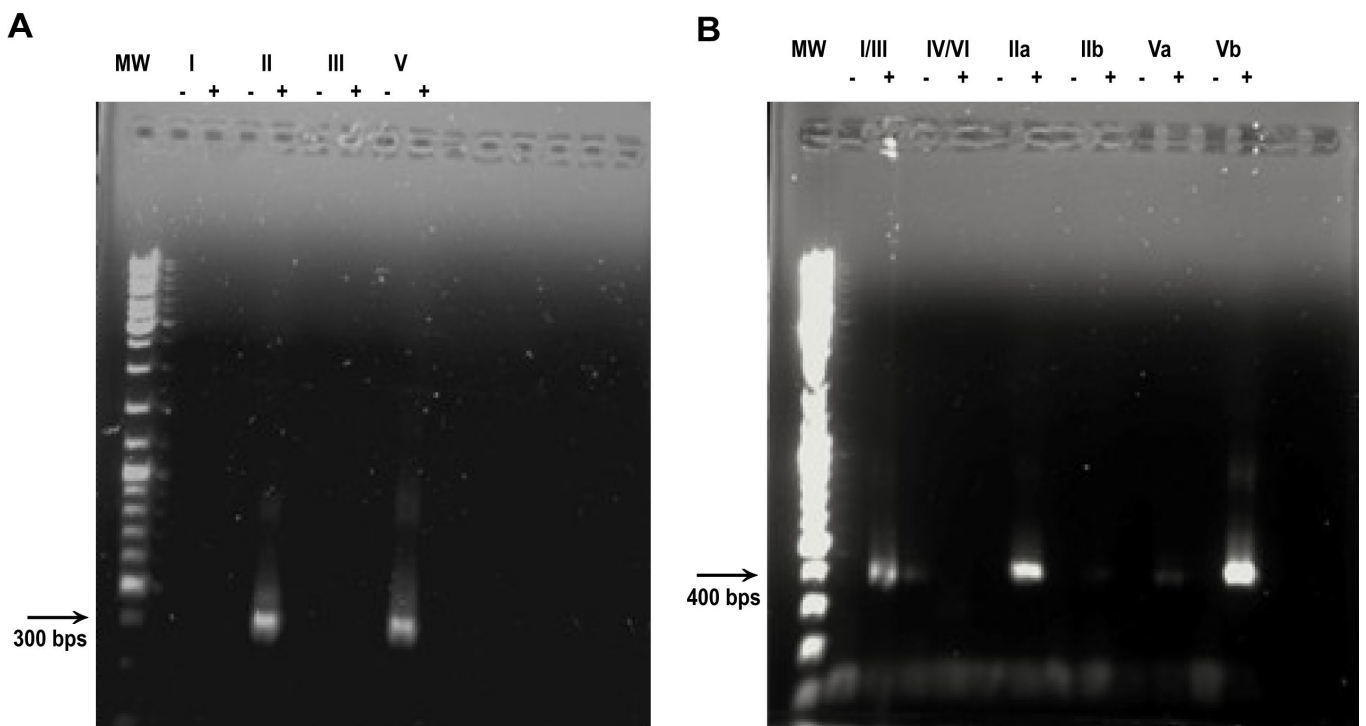


Figura 15. Análise da eficiência dos iniciadores construídos na amplificação dos fragmentos de DNA da região variável de MAb 4E12.

Amostras de cDNA obtidas por RT-qPCR a partir do RNA extraído das células de hibridoma produtoras de MAb 4E12 foram amplificadas por PCR com diferentes pares de iniciadores. Eletroforese em Gel de Agarose mostrou que 50% dos iniciadores amplificou os fragmentos de maneira eficiente. **(A)** Sequências da cadeia pesada **(B)** Sequências da cadeia leve **MW:** Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder. **Eixo X:** (-) Reação com Iniciador e sem template (+) Reação com Iniciador e Template.

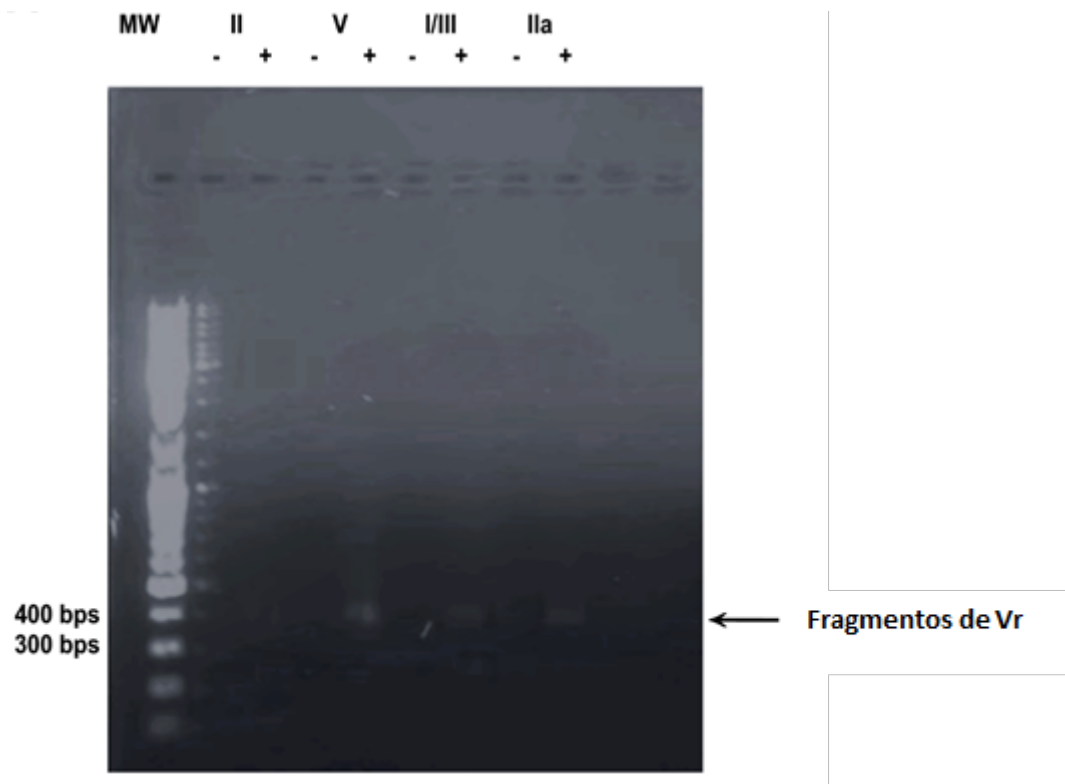


Figura 16. Purificação das bandas dos fragmentos de DNA da região variável de MAb 4E12.

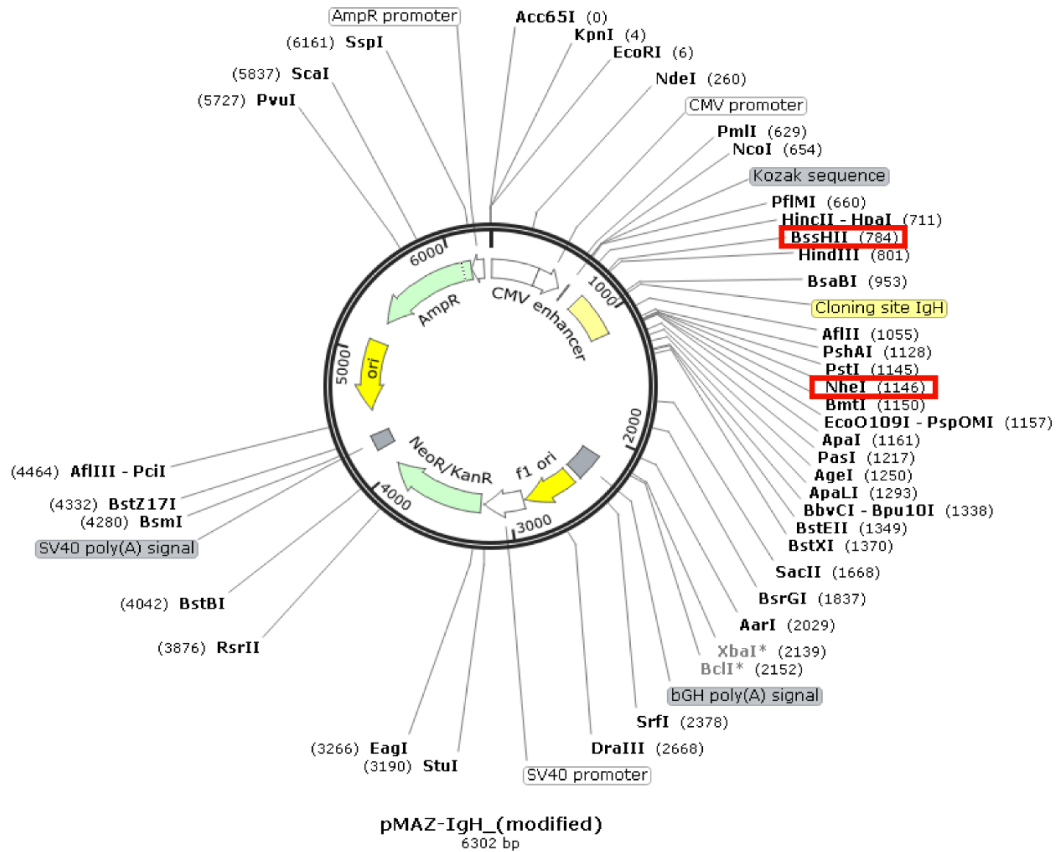
As bandas contendo as sequências de cadeia pesada obtidas por amplificação com VH-II/CH-UNI e VH-V/CH-UNI, e bandas contendo as sequências de cadeia leve obtidas por amplificação com VL-I/III/CL-UNI e VL-IIa/CL-UNI, foram extraídas do gel de agarose e purificadas com Kit de Extração para Gel (QIAquick). Apenas bandas de aproximadamente 400 bps podem ser visualizadas, confirmando eliminação de bandas inespecíficas. **MW:** Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder. **Eixo X:** (II e V) Iniciadores senso para cadeia pesada (I/III e IIa) Iniciadores senso para cadeia leve.

5.3.6. Vetores pMAZ e os sítios de inserção para as sequências da região variável do MAb 4E12

Os vetores pMAZ-VH e pMAZ-VL, construídos para clonagem de domínios variáveis e para expressão de imunoglobulinas contendo região Fc humana do subtipo IgG1, foram linearizados conforme descrito na sessão 4.2.16. As bandas de 6,3 Kb e 6,07 Kb, respectivamente, foram extraídas do gel e purificadas. A clonagem foi feita por meio de reações entre as amostras linearizadas e purificadas contendo o plasmídeo pMAZ IgH e o fragmento para cadeia pesada, ou contendo o plasmídeo

pMAZ IgL e o fragmento para cadeia leve. Os sítios de inserção, logo após a sequência Kozak, foram BssHII, e NheI ou BsiWI, conforme assinalado na Figura 17.

A



B

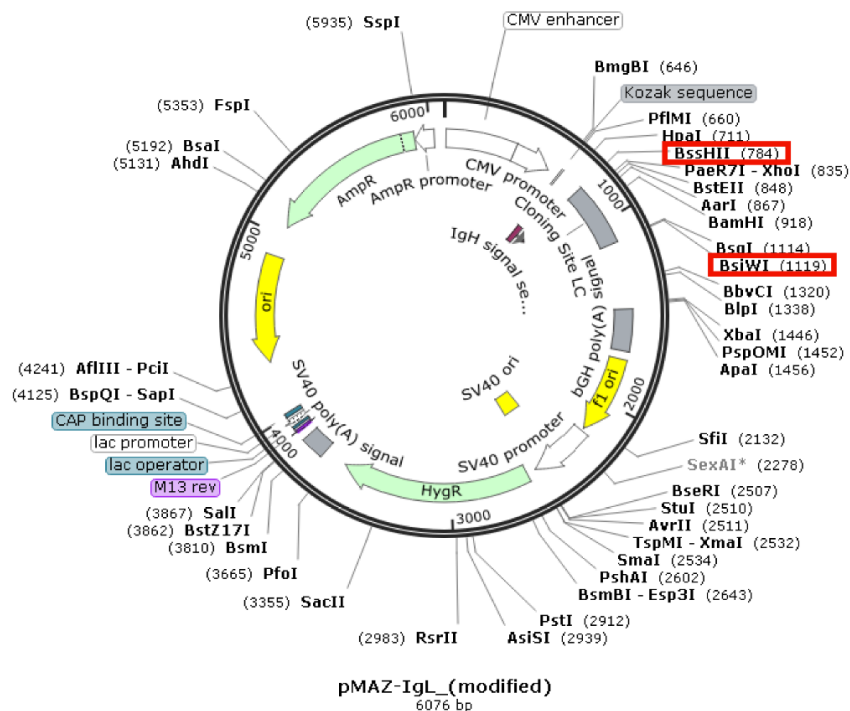


Figura 17. Vetores de expressão de IgG quimérico em células de mamíferos.

Os plasmídeos apresentados foram construídos com elementos essenciais à tradução de sequência alvo inserida à jusante de sequência codante para porção Fc humana, e para expressão em células de mamíferos. O fragmento de cadeia pesada da região variável murina foi inserido entre BssHII e NheI no vetor pMAZ-IgH. O fragmento de cadeia leve foi inserido entre BssHII e BsiWI no vetor pMAZ-IgL. Os sítios de clonagem estão assinalados em vermelho.

A sequência Kozak é fundamental para que a tradução se inicie a partir do códon de iniciação correto, elementos comuns como o promotor CMV e a sequência sinal SV40 polyA também são importantes para melhorar a eficiência da tradução do gene alvo.

5.3.7. Confirmação da localização e do tamanho dos insertos após clonagem no vetor pMAZ

Os plasmídeos clonados foram transformados em *E. coli* DH5 alpha. Dez colônias de cada transformante, DH5 α :.pMAZ-VH:.VrHc e DH5 α :.pMAZ-VL:.VrLc, foram coletadas e lisadas para propagação do DNA plasmidial utilizando o QIAprep Miniprep kit (QIAGEN, USA). Os clones foram analisados por Eletroforese em gel de Agarose após digestão dupla com as enzimas de restrição BssHII e NheI para o vetor clonado com a sequência de cadeia pesada murina, ou BssHII e BsiWI para o vetor clonado com a sequência de cadeia leve. A Figura 18 mostra bandas dos plasmídeos na sua forma circular, as bandas linearizadas correspondentes e as bandas dos fragmentos Vr de aproximadamente 400 bps.

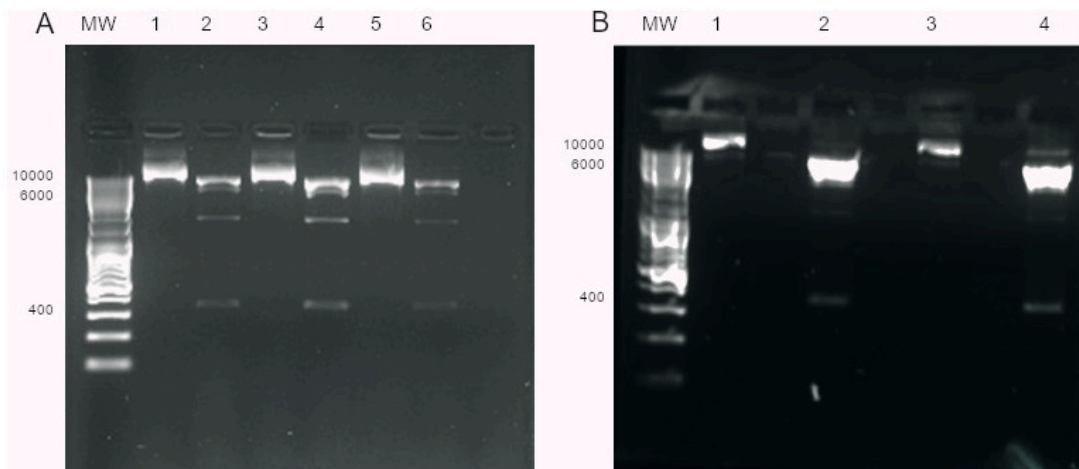


Figura 18. Análise e confirmação de clonagem dos insertos nos sítios corretos.

Os clones foram analisados quanto à localização e tamanho dos fragmentos de DNA antes de serem sequenciados. Os plasmídeos circulares apresentam maior resistência durante corrida eletroforética, sendo visualizados numa posição acima no gel de agarose. Os plasmídeos digeridos apresentam duas bandas, uma correspondente ao vetor linearizado com tamanho em torno de 6 Kb e outra correspondente à cadeia pesada, ou leve, da região variável, com tamanho em torno de 400 bps. **(A)** Digestão dupla de diferentes clones de pMAZ::VrLc – (1,3 e 5): Plasmídeo intacto; (2, 4 e 6): Plasmídeo digerido **(B)** Digestão dupla de diferentes clones de pMAZ::VrHc - **(1 e 3)**: Plasmídeo intacto; **(2 e 4)**: Plasmídeo digerido **MW**: GeneBio Systems-Ruler 1 kb DNA Ladder Plus.

5.3.8. Análises dos resultados de Sequenciamento

As amostras contendo os fragmentos analisados por digestão, conforme indicado na subseção 5.2.7, foram preparadas e sequenciadas, utilizando método Sanger e CMV-F como iniciador senso, pela empresa GENEWIZ (como descrito na subseção 4.2.18). Os resultados contendo as sequências extraídas dos diferentes clones foram analisados no Software Snapgene quanto às características, tamanho e localização dos fragmentos. A ferramenta IMGT_V-QUEST foi utilizada para verificar a porcentagem de identidade quanto aos alelos e genes VDJ em comparação com as espécies *Mus musculus* e *Homo sapiens*. As sequências codantes para cadeia leve e pesada apresentaram mais de 90% de identidade com a espécie murina. A sequência

para cadeia leve apresentou em torno de 50% de identidade com a espécie humana, enquanto a sequência para cadeia pesada apresentou em torno de 70%.

Os genes alvo foram corretamente traduzidos em fase de leitura. As cisteínas para formação de pontes dissulfeto foram localizados nas sequências para cadeia pesada (Tabela 2 e Tabela 3). A ligação garante que os braços dos fragmentos Fab (porção N-terminal) estejam unidos ao fragmento Fc (porção C-terminal). As análises indicaram sequências com características suficientes para produção de anticorpo quimérico.

Tabela 2. Sequências compreendendo fragmentos de DNA para cadeia pesada e região constante, traduzidas em fase de leitura aberta.

Sequências compreendendo fragmentos de DNA para cadeia pesada e região constante, traduzidas em fase de leitura aberta. As sequências compreendem exons delimitados por sequências não traduzidas (UTRs).

#5'3' Frame 2

pMAZ:.Vr	Sequência gênica	Sequência traduzida
Cadeia Pesada	<pre> nnnnnnnnnnnnnnnnntagcaganctttctgg ctaactagagaacccactgcttactggcacgtggaa attaatacgacgtggccacatgggatggagctgtat catcctcttcttgtagcaacagctacaggaagggg ttaacagtagcaggcttgaggctggacatatatg ggtgacaatgacatccacttgccttctctccacagg cgcgactccgaggttcagcttcagcagctctgggct gagctggtgaggcctggggcttcagtgaagctgtcct gcaaggcttgggctacacattcactgactatgaggt ccactggctgaaggagatgcctgtgcatggcctgg aatggattggaggtattgatccaagaagcggcgcta ctgcctacaatcagaagtcaagggaaggccaca ctgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatg gagctcagcagcctgacatctgaagactcttctgtct attattgtacaagacgactgggccaactggggccaag gcaccactctcacagtctcctcagctagaccaagg gccatcgggtctccccctggcaccctcctccaagag cacctctgggggcacagcggccctgggctgctggt caaggactactccccgaaccggtgacgggtgctg gaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacct tccggctgtcctacagtctcaggactctactccctc agcagcgtggtgaccgtgccctccagcagctgggg </pre>	<pre> XXXXXXXXSRXFWLTREPTAYWHVEINTTWPPWDGA VSSSSW-QQLQVRG-Q-QA-GLDIYMGDNDIHFAF LSTGAHSEVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTF TDYEVHWLKEMPVHGLEWIGGIDPRSGATAYNQK FKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSSVYYCTRRL GHWGQGTTLVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTXV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEXPGETVSLPLPPKTX RTPS-SPGPLRSHXXXXERXPRXX-GQVXSYXXXXX XIXXXXXXXXXXXXXX </pre>

acccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcc
 cagcaacaccaangtggacaagaaagttgagccc
 aaatctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgc
 ccagcacctgaanctcctggggagaccgtcagtctt
 cctctcccccaaaaaccnaaggacaccctcatga
 tctcccgaccctgaggtcacatgncntggnggn
 ggaacgtganccacgaanancctgaggtcaagttt
 canctggntacntngnnggnnnnnnnngcataan
 gnccaanannannccnngggannncagtannn
 nnnnncntaccnnnnggnannnnncntcan
 nn

***Destacam-se em vermelho as sequências de cisteínas**

Tabela 3. Sequências compreendendo fragmentos de DNA para cadeia leve e região constante, traduzidas em fase de leitura aberta.

Sequências compreendendo fragmentos de DNA para cadeia leve e região constante, traduzidas em fase de leitura aberta. As sequências compreendem exons delimitados por sequências não traduzidas (UTRs).

#5'3' Frame 2

pMAZ:.Vr	Sequência gênica	Sequência traduzida
Cadeia Leve	ccnnnnnnnnnnnnnnnnnnngcagagctttctgg ctaactagagaacccactgcttactggcacgtggaa attaatacgacgtggccaccatgggatggagctgtat catcctcttcttgtagcaacagctacaggaagggg ttaacagtagcaggcttgaggtctggacatatatg ggtgacaatgacatccacttgccttctctccacagg cgcgactccgatatccagatgaccagtcctccga gctccctgtccgcctctgtgggcatagggtcacat cacctgcaaggcgagccaggatgtgaccaccgctg tagcctggatcaacagaaaccaggaaaagctccg aagcttctgattactgggagcagcccgccataccg gcggtccgagccgcttagcggcagcggctccggg acggattcactctgaccatcagcagctcgcagccgg aagactcgcaacttactgtcagcaacattatagc accccgctgacgttcggacagggtagcaaggtgga gatcaaacgtacggtagctgacccatctgtcttcatct tccgcatctgatgagcagttgaaatctggaactgc ctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagaga ggccaaagtagcagtggaaggtggataacgcccctcc	XXXXXXXRAFwLREPTAYWHVEINTTWPPWDGA VSSSSW-QQLQVRG-Q-QA-GLDIYMGDNDIHFAF LSTGAHSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDV TTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSG SSGTDFLTISSLPEDFATYYCQHYSTPLTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHXA-ARPSQRAS TGXXVNLEGPFKPADQPRLLXPAICXXPLPRAFLD PXXATPTVLSXXXXMHRMXXXXSFXXGGVGVXGXX

```

aatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcag
gacagcaaggacagcacctacagcctcagcagca
ccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaaca
caaagtctacgcctgcgaagtacccatcnggcctg
agctcgcccgtcacaagagctcaacaggggan
antgtaatctagagggcccgtttaaacccgctgac
agcctgactgtgccttctantnccagccatctgtgnt
ngccccccccgtgccttccttgaccctggnnnngc
cactcccactgtcctttctanaantgngnaatgcatc
gcatgntgantannngtcattcnattctgggggggt
ggggnnngggnnnnnn

```

5.3.9. Obtenção de anticorpo quimérico contra HSP60 purificado

Com a confirmação das sequências, os vetores clonados foram transfectados em células HEK 293. O sobrenadante de cultura foi coletado após 6 dias de incubação para expressão em pequena ou larga escalas. A aplicação de proporção equilibrada (1:1) dos plasmídeos para cadeia pesada (56 kDa) e cadeia leve (26 kDa) se mostrou mais apropriada para a expressão do anticorpo quimérico, conforme análise sob condições redutoras das frações eluídas após purificação dos sobrenadantes de cultura obtidos por transfecção em pequena escala (Figura 19).

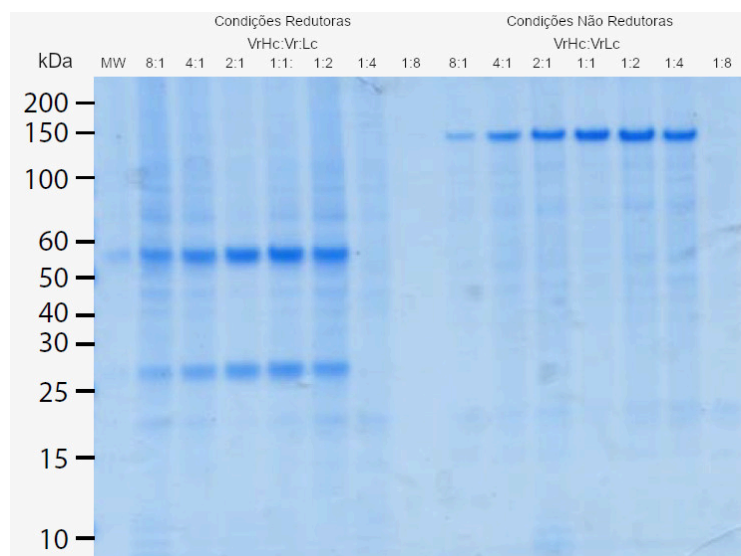


Figura 19. Eletroforese por SDS-PAGE e Native-PAGE das amostras de anticorpos quiméricos purificadas após expressão em pequena escala.

Amostras preparadas sob condições redutoras, na presença de Beta-Mercaptoetanol, foram separadas em bandas contendo as regiões com cadeia pesada ou com cadeia leve. A proporção de 1:1 dos plasmídeos pMAZ:.VrHc e pMAZ:.VrLc se mostrou ideal para a expressão em larga escala.

Após otimização das condições para expressão do anticorpo quimérico, o sobrenadante de cultura obtido de transfecção em larga escala foi purificado por afinidade em equipamento ÄKTA. A análise por eletroforese confirmou eficiência da purificação (Figura 20). A análise cromatográfica da segunda etapa de purificação, por filtração em gel, mostrou uma quantidade irrisória de proteína agregada eluída após aproximadamente 120 mL de corrida (Figura 21). Os eluatos contendo a quimera foram coletados, agrupados e concentrados. O rendimento de um volume inicial de 600 mL de transfecção foi de 1,8 mg/mL de anticorpo com alto grau de pureza em um volume final de 3 mL.

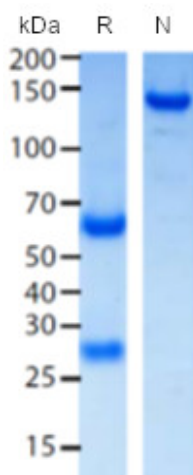


Figura 20. Eletroforese por SDS-PAGE e Native-PAGE da amostra de anticorpo quimérico purificada após expressão em larga escala.

Purificação por afinidade de sobrenadante de cultura, após transfecção com plasmídeos pMAZ (1:1) se mostrou eficiente. Amostras preparadas sob condições redutoras foram separadas em bandas contendo as regiões com cadeia pesada ou com cadeia leve.

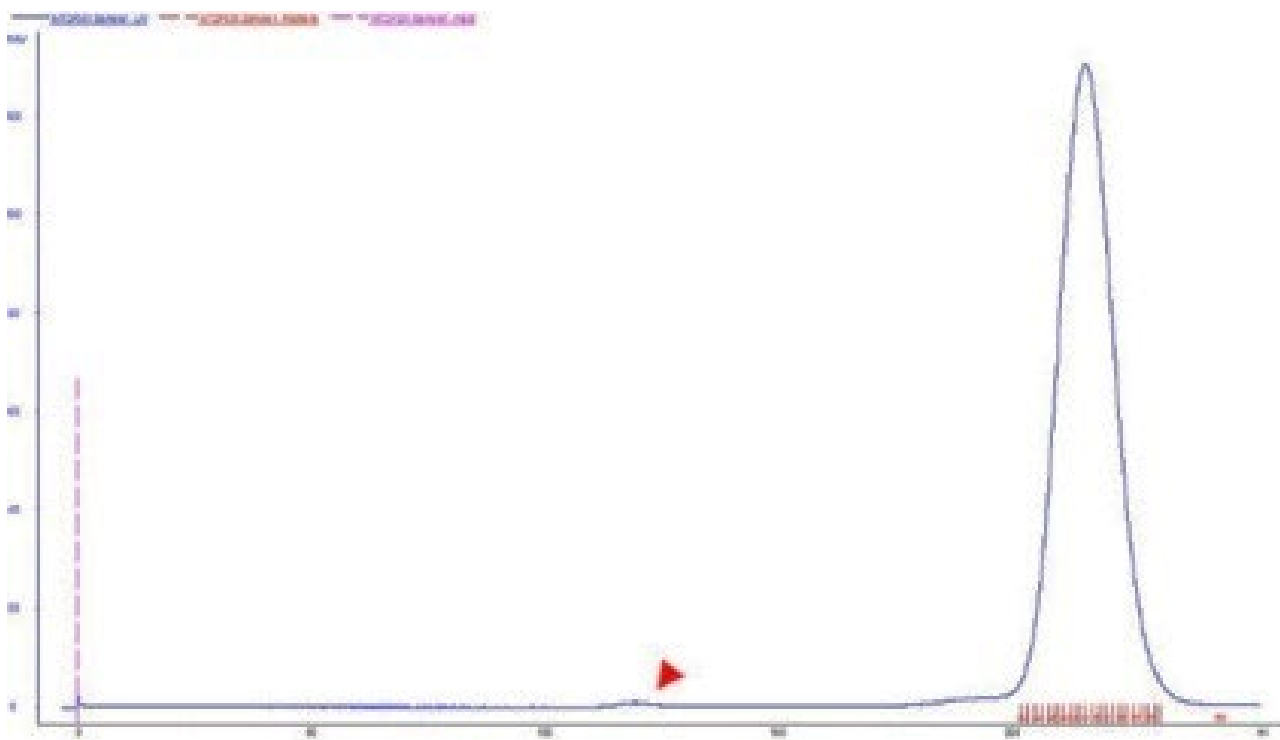


Figura 21. Método cromatográfico de purificação por Filtração em Gel.

Uma pequena porção de anticorpo ficou agregada e foi separada em fração eluída após 120 mL de corrida cromatográfica. O anticorpo quimérico começou a eluir em 200 mL, apresentando pico no volume de 215 mL. **Seta vermelha:** O agregado pode ser notado como um rastro no gráfico.

5.3.10. O anticorpo quimérico manteve a reatividade contra HSP60

A fim de verificar a especificidade para HSP60 e comparar a afinidade do anticorpo quimérico com o anticorpo monoclonal parental, foi realizado um immunoblotting contra extratos proteicos de *H. capsulatum* G217B, *P. lutzii* Pb01 e *P. brasiliensis* Pb18, a proteína recombinante foi utilizada como controle positivo. O ch-MAb reagiu com uma proteína nos extratos tendo um peso molecular equivalente ao de Hsp60. A análise mostrou uma diminuição da afinidade do anticorpo quimérico em relação ao anticorpo monoclonal (Figura 22).

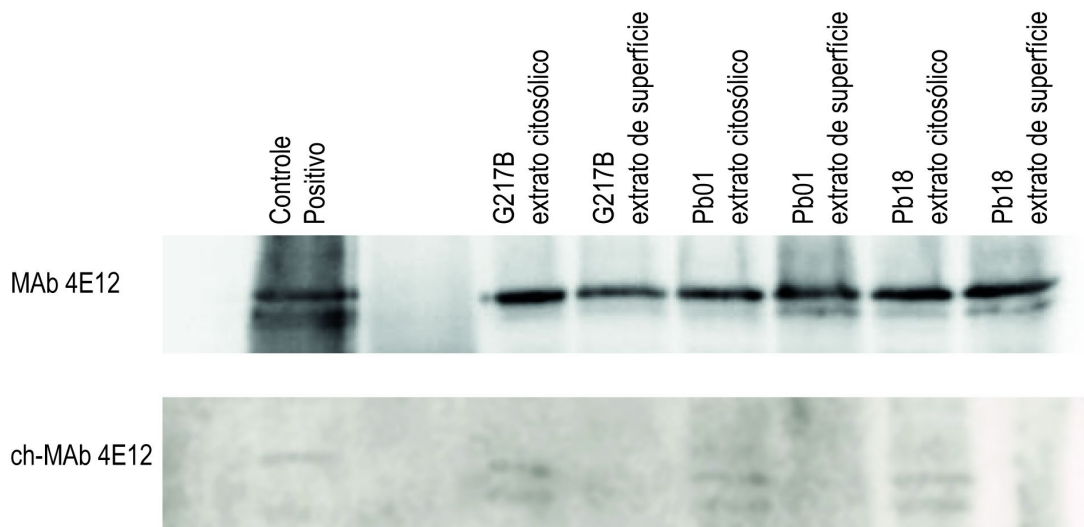


Figura 22. ch-MAb 4E12 reconhece a HSP60 na amostra contendo a proteína recombinante e nos extratos proteicos.

O reconhecimento antigênico se manteve após quimerização, no entanto, o ch-MAb 4E12 mostrou menor afinidade pelo alvo quando testado na mesma concentração do MAb 4E12.

5.3.11. Afinidade do anticorpo quimérico comparada a do anticorpo monoclonal correspondente

A análise quantitativa por ELISA corrobora com a análise qualitativa por Western Blot. A comparação dos valores de absorvância, resultantes da interação entre os anticorpos (titulados a partir da mesma concentração e na mesma razão) e a rHSP60, mostrou uma redução na afinidade do anticorpo quimérico composto pelas regiões variáveis derivadas do anticorpo monoclonal 4E12. Também é possível observar que o MAb 4E12 mantém a afinidade com a diminuição da concentração enquanto o ch-MAb 4E12 tem a afinidade reduzida de maneira dose dependente (Figura 23).

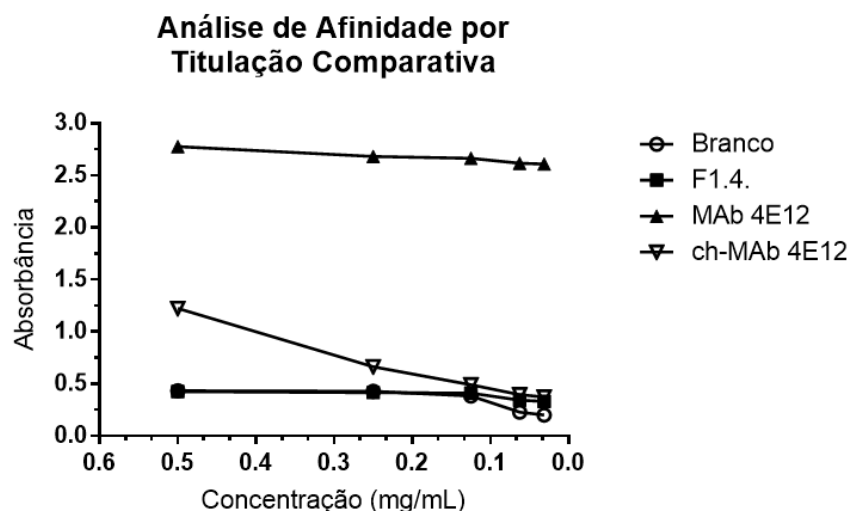


Figura 23. Quimera derivada de MAb 4E12 mostrou perda de afinidade pela HSP60.

Diluição seriada de ch-MAb 4E12 e MAb 4E12 mostrou redução de afinidade da quimera pela HSP60 recombinante, comparando a reatividade dos anticorpos nas mesmas concentrações. O MAb F1.4 anti- β -glucano, utilizado como controle negativo, resultou em absorbâncias similares às obtidas para o branco (PBS1X).

5.3.12. Anticorpo quimérico contra HSP60 é capaz de aumentar a capacidade fagocítica *in vitro* das espécies *H. capsulatum* e *P. lutzii*

Macrófagos THP1, estimulados ou não com Interferon gamma (IFN γ), foram co-cultivados com leveduras de *H. capsulatum* (G217B) e *P. lutzii* (Pb01). Leveduras não foram opsonizadas foram utilizadas como controle negativo, leveduras opsonizadas com anticorpo irrelevante foram utilizadas como um segundo controle. Grupos contendo leveduras opsonizadas com amostras de soro obtidas de pacientes diagnosticados com Histoplasmose ou Paracoccidioidomicose foram considerados controles positivos. Nos grupos de tratamento as leveduras foram opsonizadas com 5, 10 ou 50 μ g do anticorpo quimérico contra HSP60 de *H. capsulatum*. O início da fagocitose foi observado após 2 horas de incubação, para *H. capsulatum*, e 8 horas para *P. lutzii*. A análise comparativa da capacidade fagocítica dos macrófagos THP1 foi feita com 8 horas de incubação para ambos os isolados (Figura 24). As leveduras foram coradas com Calcofluor-White para facilitar a contagem dos macrófagos contendo fungos internalizados por microscopia de fluorescência (Figura 25 e Figura

26). A coloração com Giemsa também possibilitou a observação da fagocitose por microscopia óptica.

Todas as concentrações utilizadas do anticorpo quimérico aumentaram significativamente a fagocitose dos isolados *H. capsulatum* G217B e *P. lutzii* Pb01 em relação ao controle negativo. As porcentagens de fagocitose obtidas na presença de ch-MAb 5 e 10 µg foram semelhantes às obtidas após opsonização com soro policlonal humano contra *H. capsulatum*. Não houve diferença significativa na porcentagem de fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com soro policlonal contra *P. lutzii* ou com anticorpo irrelevante. O aumento mais expressivo da fagocitose foi obtido na presença de ch-MAb 50 µg. O estímulo com IFN γ aumentou a captação de leveduras não opsonizadas, mas não influenciou na eficiência da fagocitose de leveduras opsonizadas com o anticorpo quimérico.

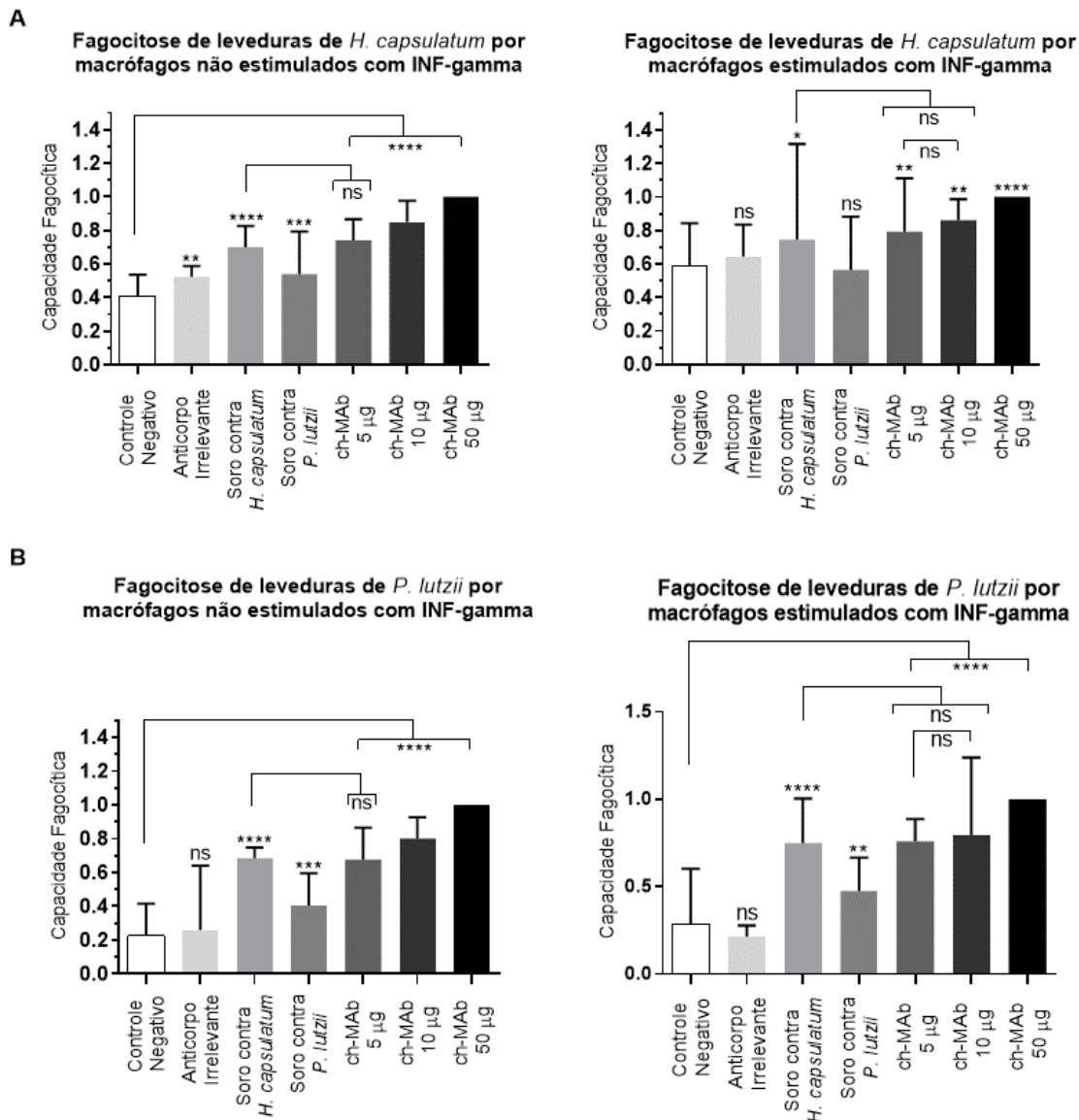


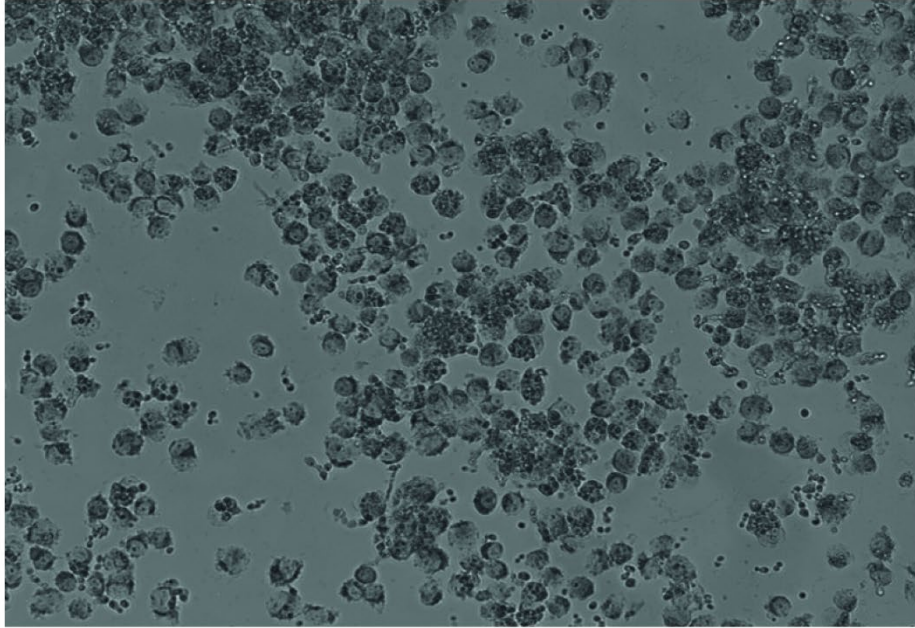
Figura 24. Ensaio de Fagocitose.

(A) Capacidade fagocítica de macrófagos THP1 desafiados com *H. capsulatum*.

(B) Capacidade fagocítica de macrófagos THP1 desafiados com *P. lutzii*.

A opsonização com anticorpo quimérico anti-HSP60 aumentou a fagocitose dos isolados G217B e Pb01 significativamente em relação às leveduras não opsonizadas. A capacidade fagocítica das leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com soro contra *P. lutzii* foi similar à obtida com anticorpo irrelevante. A capacidade fagocítica foi semelhante para leveduras opsonizadas com soro contra *H. capsulatum* e ch-MAb nas concentrações de 5 e 10 µg. O tratamento com ch-MAb 50 µg foi o mais eficaz, aumentando a capacidade fagocítica significativamente em comparação a todos os grupos. O estímulo com INFγ não influenciou na interpretação dos resultados. (*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001; (****) P < 0,0001; (ns) Não significativo. **Eixo Y:** Capacidade fagocítica (Número de fagócitos com leveduras internalizadas/100 macrófagos) em escala linear.

A



B

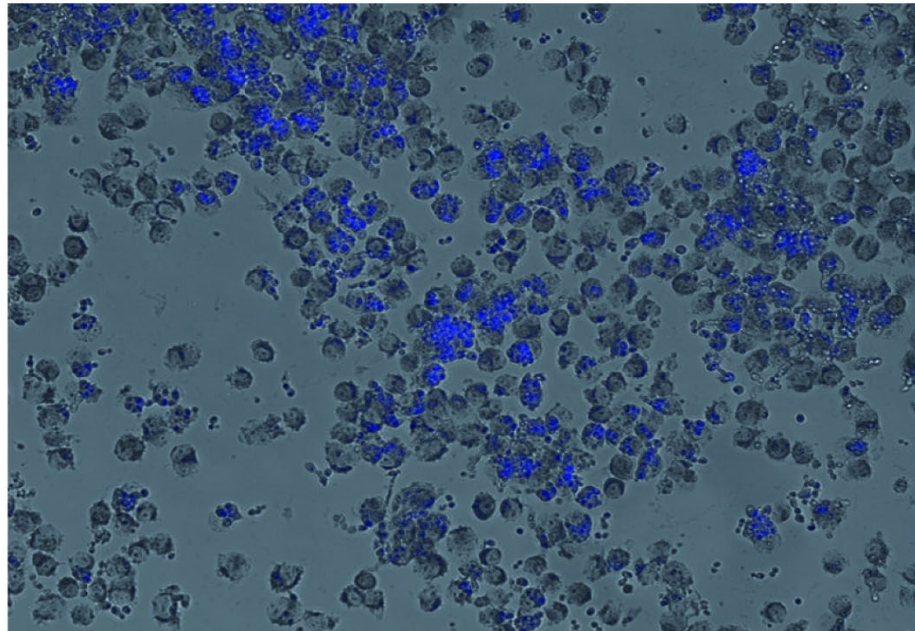
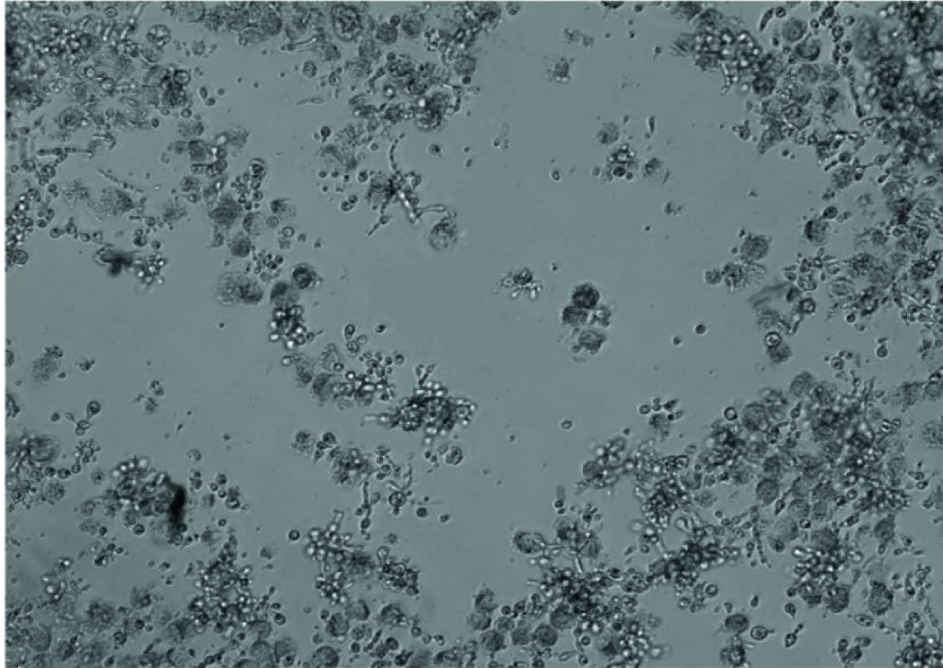


Figura 25. Detecção e captura de fagocitose por Microscopia de Fluorescência de leveduras do isolado G217B por macrófagos THP1.

Polissacarídeos beta 1-3 e beta 1-4 de quitina e celulose da parede celular das leveduras foram corados com solução de Calcofluor-White 1%. As células foram fixadas em metanol e a contagem realizada em microscópio de fluorescência. **(A) Contraste de interferência diferencial (DIC).** Nível vibracional mais baixo do estado excitado (baixo deslocamento de Stokes); **(B) Filtro para DAPI.** Emissão máxima em 461 nm (azul).

A



B

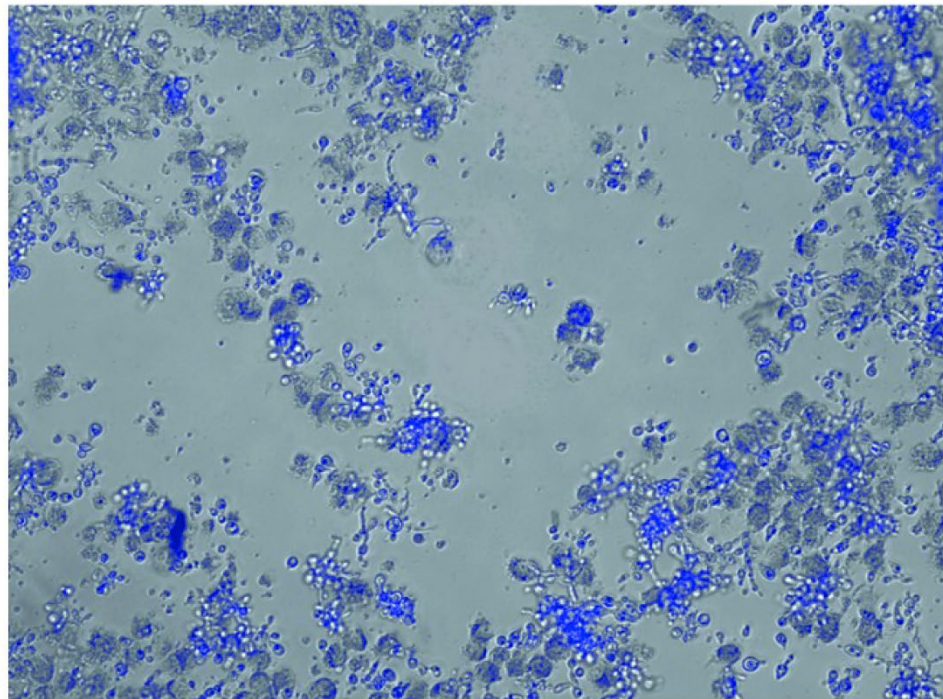


Figura 26. Detecção e captura de fagocitose por Microscopia de Fluorescência de leveduras do isolado Pb01 por macrófagos THP1.

Polissacarídeos beta 1-3 e beta 1-4 de quitina e celulose da parede celular das leveduras foram corados com solução de Calcofluor-White 1%. As células foram fixadas em metanol e a contagem realizada em microscópio de fluorescência. **(A) Contraste de interferência diferencial (DIC).** Nível vibracional mais baixo do estado

excitado (baixo deslocamento de Stokes); **(B) Filtro para DAPI.** Emissão máxima em 461 nm (azul).

Fluorescência seletiva de organelas, emitida no comprimento de onda correspondente ao filtro vermelho, foi utilizada como contra corante para localização intracelular das leveduras opsonizadas após fagocitose. Os anticorpos policlonais e quiméricos foram detectados por anticorpo secundário anti IgG conjugado a FITC, sendo possível identificar a ligação antígeno-anticorpo por marcação verde fluorescente. Quando os macrófagos fagocitam as leveduras opsonizadas ocorre uma sobreposição das duas cores, formando uma coloração amarela. O evento é demonstrado nas Figura 27 e Figura 28.

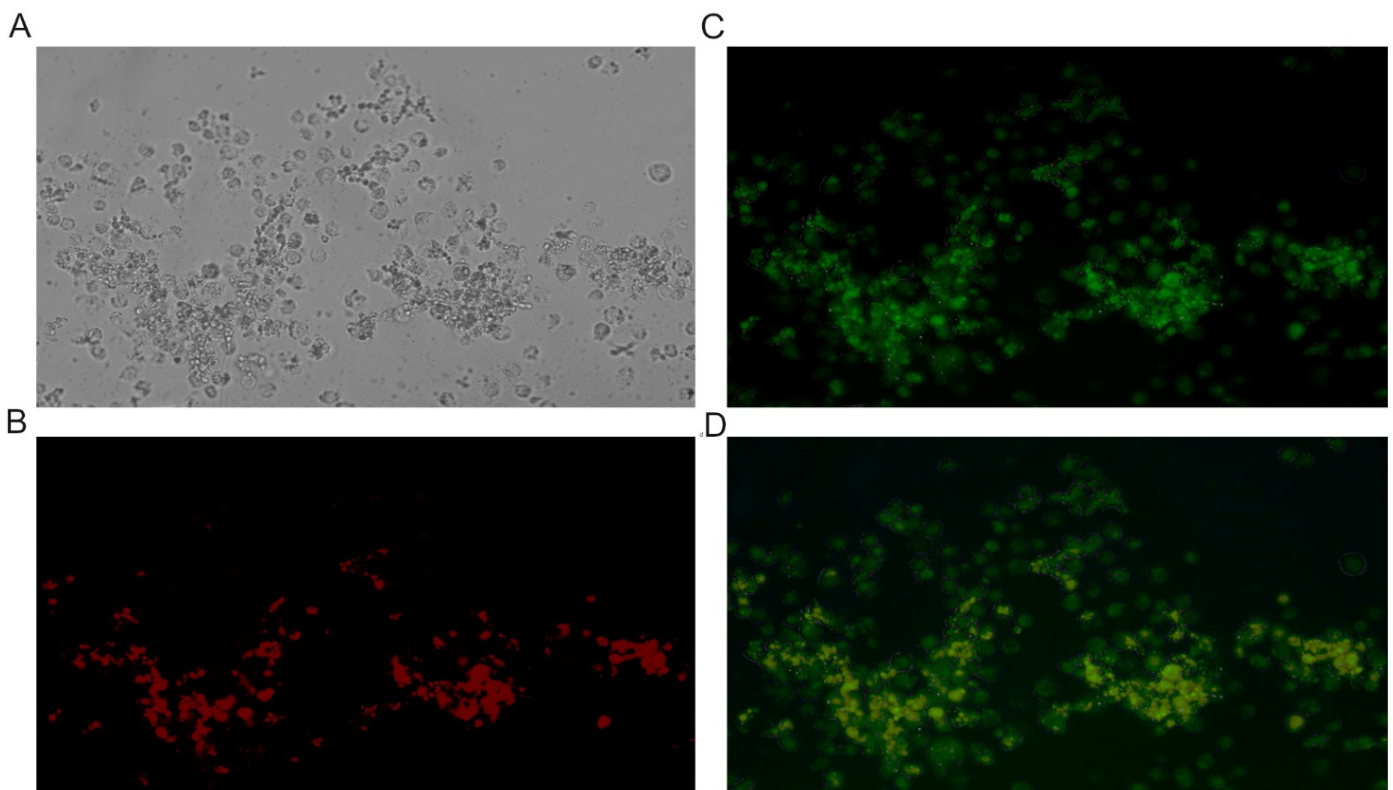


Figura 27. Marcação diferencial para demonstração do evento da fagocitose de leveduras de *H. capsulatum*, opsonizadas com Anticorpo Quimérico, por macrófagos THP1.

As células foram incubadas com anticorpo anti IgG humano conjugado com FITC. A ligação entre antígenos das leveduras e anticorpo quimérico anti HSP60 foi detectada por emissão fluorescente no canal verde. O corante lisotrópico permeou macrófagos vivos e se acumulou seletivamente nos lisossomos por meio do gradiente de pH, emitindo fluorescência em vermelho. Células que internalizaram leveduras opsonizadas formando fagolisossomas aparecem coradas em amarelo, devido sobreposição das marcações em vermelho e verde. **(A) Contraste de interferência**

diferencial (DIC). Nível vibracional mais baixo do estado excitado (baixo deslocamento de Stokes); **(B) Filtro para Rodamina.** Emissão máxima em 595 nm (vermelho); **(C) Filtro para Fluoresceína.** Emissão máxima em 520 nm (verde); **(D) Merge.** Sobreposição de imagens.

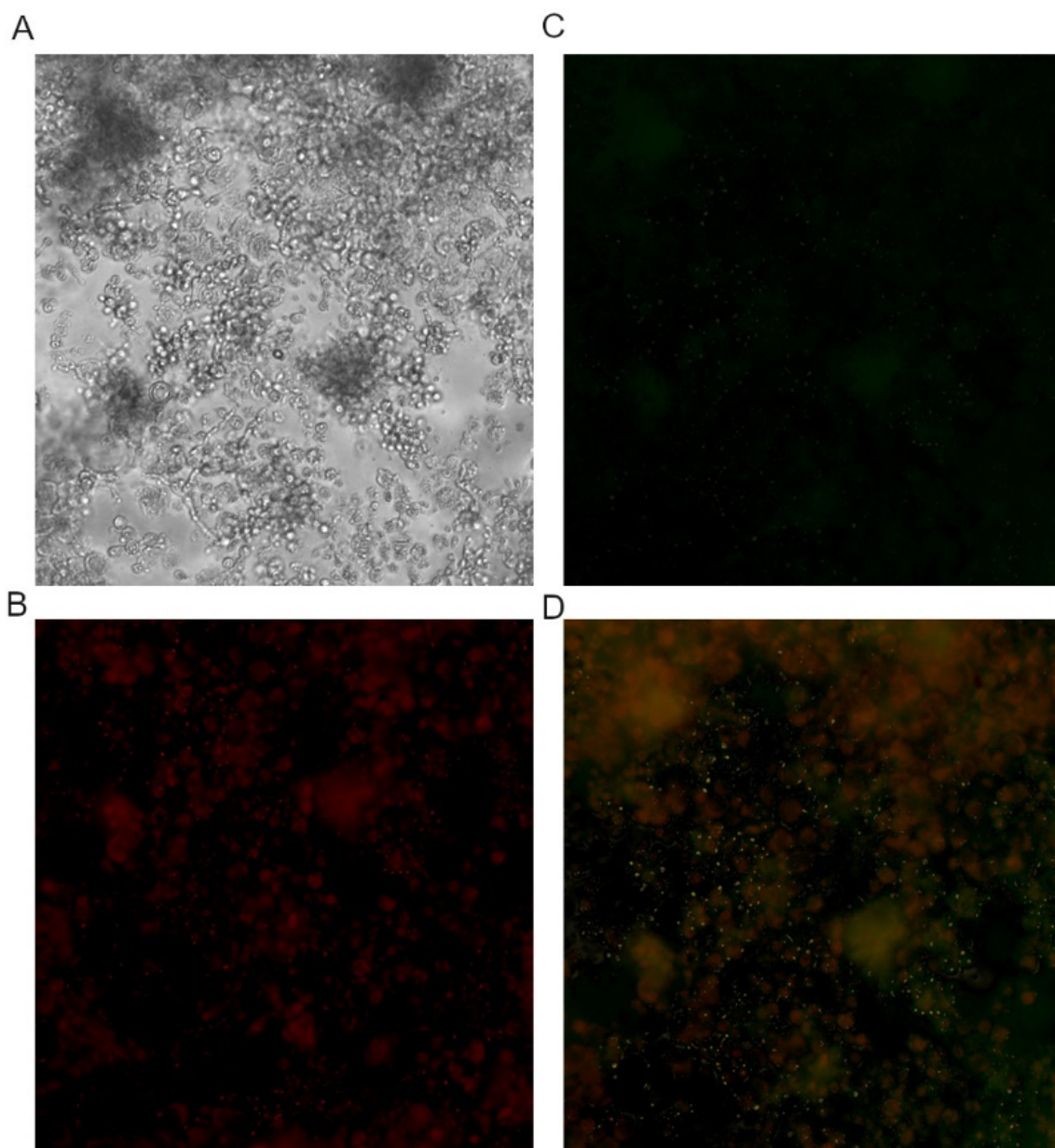


Figura 28. Marcação diferencial para demonstração do evento da fagocitose de leveduras de *P. lutzii*, opsonizadas com Anticorpo Quimérico, por macrófagos THP1.

As células foram incubadas com anticorpo anti IgG humano conjugado com FITC. A ligação entre antígenos das leveduras e anticorpo quimérico anti HSP60 foi detectada por emissão fluorescente no canal verde. O corante lisotrópico permeou macrófagos vivos e se acumulou seletivamente nos lisossomos por meio do gradiente de pH, emitindo fluorescência em vermelho. Células que internalizaram leveduras opsonizadas formando fagolisossomos aparecem coradas em amarelo, devido

sobreposição das marcações em vermelho e verde. **(A) Contraste de interferência diferencial (DIC)**. Nível vibracional mais baixo do estado excitado (baixo deslocamento de Stokes); **(B) Filtro para Rodamina**. Emissão máxima em 595 nm (vermelho); **(C) Filtro para Fluoresceína**. Emissão máxima em 520 nm (verde); **(D) Merge**. Sobreposição de imagens.

5.3.13. Viabilidade celular de macrófagos incubados com anticorpo quimérico ch-MAb 4E12

O ensaio para análise quantitativa da toxicidade celular, na presença de ch-MAb 4E12, foi baseado na atividade mitocondrial por redução de MTT. A viabilidade celular de macrófagos ($\% = \text{DO Grupo Tratado} \times 100 / \text{Média DO Grupo Controle}$) foi preservada acima de 80% na presença do anticorpo quimérico com até 10 μg . A DL50 (Dose letal para 50% das células) para macrófagos de linhagem humana corresponde à 50 μg (Figura 29).

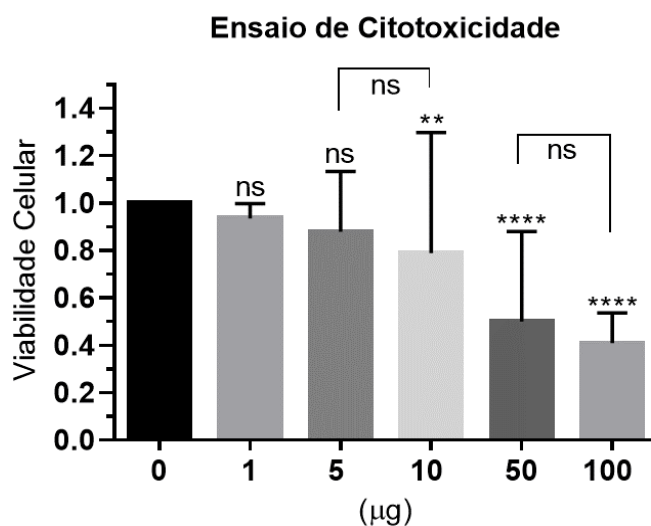


Figura 29. Ensaio de citotoxicidade por redução de MTT.

Não houve redução significativa da viabilidade celular de macrófagos THP1 incubados com 1 ou 5 μg de ch-MAb. Incubação com 50 μg de ch-MAb levou a 50% (0,5) de morte celular. Macrófagos cultivados sem a presença do anticorpo quimérico foram utilizados como controle negativo para toxicidade (100% de viabilidade). (**) Valor de $P < 0,01$; (****) Valor de $P < 0,0001$; (ns) Não significativo. **Eixo Y:** Viabilidade celular ($\text{DO Grupo Tratado} / \text{Média DO Grupo Controle}$) em escala linear.

5.3.14. Ensaio preliminar de toxicidade aguda em *G. mellonella*

Larvas de *G. mellonella* tratadas com doses entre 1 e 50 μg do anticorpo quimérico foram observadas durante 7 dias. A administração do anticorpo monoclonal parental MAb 4E12 (Grupo controle positivo), do ch-MAb 1 μg , e do ch-MAb 5 μg , não reduziu a taxa de sobrevivência (93,75%) das larvas em comparação ao grupo sem tratamento e ao grupo que recebeu apenas PBS. Doses de 10 e 25 μg do anticorpo quimérico reduziram a sobrevivência das larvas para 81,25%, enquanto a administração de ch-MAb 50 μg reduziu a sobrevivência para 75% (Figura 30).

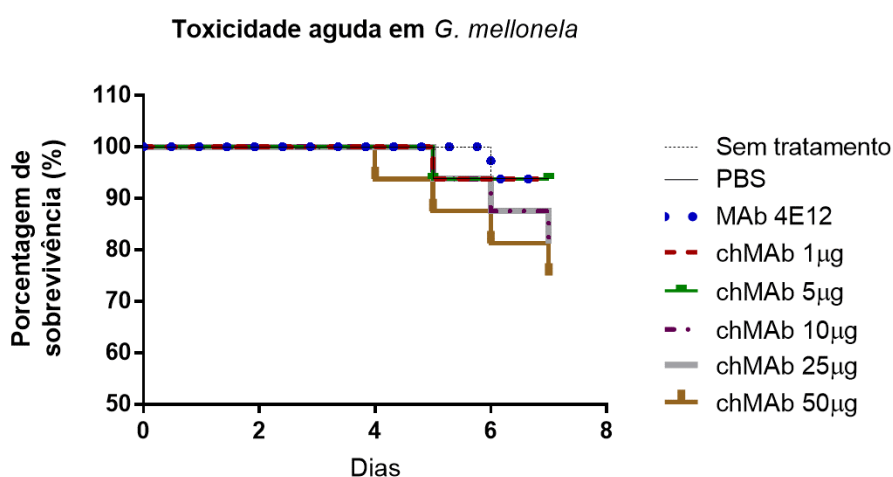


Figura 30. Curva de Kaplan-Meier para análise de sobrevivência.

As curvas mostram tendência significativa, (*) P valor 0,03, para redução da taxa de sobrevivência com administração a partir de 10 μg de ch-MAb. Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

5.3.15. Carga fúngica pulmonar e esplênica de camundongos após 7 dias de infecção por *H. capsulatum*

A avaliação da atividade protetora *in vivo* do anticorpo quimérico foi realizada pela contagem de UFC nos pulmões e baços dos animais eutanasiados após 7 dias de infecção. O grupo tratado com o anticorpo monoclonal parental MAb 4E12 (controle positivo) e os grupos que receberam 1 ou 5 μg de chMAb 4E12 tiveram reduções significativas na carga fúngica em comparação com os grupos de controle

negativo. Não houve diferença estatística significativa entre as cargas fúngicas do grupo que não recebeu tratamento e do grupo tratado com anticorpo irrelevante (Figura 31). Doses de 10 e 25 µg também foram testadas e não reduziram o número de UFC nos órgãos dos animais com histoplasmose experimental (dados não mostrados).

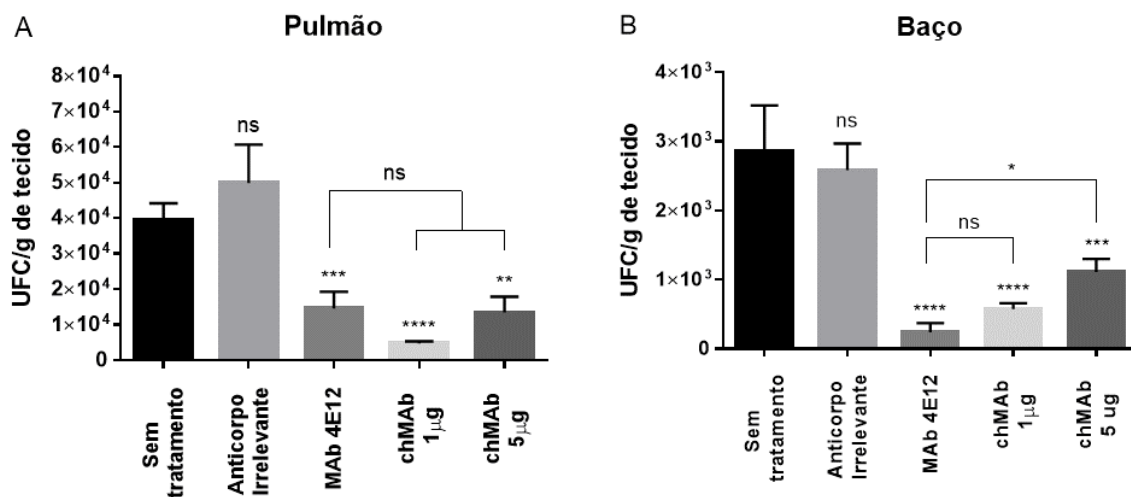


Figura 31. Números de UFC nos (A) pulmões e (B) baços de camundongos após 7 dias de infecção por *H. capsulatum* var. *capsulatum*.

Os grupos tratados com ch-MAB 1 e 5 µg, e com o anticorpo monoclonal parental MAb 4E12 5 µg (controle positivo), tiveram redução significativa da carga fúngica em comparação com grupos de controle negativo. Os grupos que não receberam tratamento ou tratamento com MAb irrelevante não apresentaram diferença estatística. O gráfico para UFC de pulmão reflete os resultados obtidos com 38 animais. O gráfico para UFC de baço reflete os resultados obtidos com 34 animais. (**) $P < 0,01$; (***) $P < 0,001$; (****) $P < 0,0001$; (ns) Não significativo.

5.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nesse trabalho a engenharia de proteínas foi utilizada, com fins terapêuticos, na conversão de um anticorpo monoclonal de origem murina para uma forma quimérica constituída por região constante com sequência gênica humana. O RNA utilizado como template para amplificação das regiões variáveis leves e pesadas, contendo as CDR s de ligação ao antígeno HSP60 (Proteína de Choque Térmico de ~ 60 kDa proveniente de *H. capsulatum*, obtida por expressão heteróloga), foi extraído

de células de hibridoma produtoras do MAb 4E12, produzido por Guimarães e colaboradores (2009). O MAb de IgG2a 4E12 prolongou significativamente a sobrevivência de camundongos infectados com *H. capsulatum*, testes histológicos mostraram redução da carga fúngica e de danos aos órgãos afetados, o anticorpo ainda promoveu aumento dos níveis de citocinas associadas à resposta do tipo Th1 (GUIMARÃES et al., 2009). O MAb 4E12 também foi protetor em camundongos com PCM experimental por *P. lutzii*, reduzindo significativamente a carga fúngica e os danos no tecido pulmonar (THOMAZ et al., 2014).

A terapia baseada em anticorpos monoclonais tem se tornando importante no tratamento de doenças infecciosas, principalmente devido ao aumento da resistência dos microorganismos às terapias usuais, ao número crescente de pacientes imunocomprometidos e ao surgimento de novos patógenos. No entanto, uma grande limitação do uso de MAbs derivados de hibridoma é a sua capacidade em gerar uma resposta imune no hospedeiro estimulando a produção de anticorpos humanos anti-anticorpos de camundongo (DANG et al., 2013). Os HAMAs levam à eliminação mais rápida dos MAbs e podem gerar reações alérgicas (LU et al., 2020). A humanização desses anticorpos, sem alterar sua afinidade antigênica, tem sido uma alternativa eficaz para a redução da sua imunogenicidade (GG, 2000). A geração de MAbs humanizados por enxerto de CDR é uma das técnicas mais simples e populares, consistindo na combinação dos domínios variáveis de anticorpos murinos com domínios constantes de imunoglobulinas humanas. A quimerização foi originalmente desenvolvida, em 1986, por Winter e colaboradores (JONES et al., 1986). O primeiro anticorpo quimérico aprovado pela FDA para terapia em humanos foi o Daclizumab (Zenapax), anticorpo anti-cadeia alpha do receptor de IL-2 (CD25), em 1997, no tratamento preventivo da rejeição de transplantes (TSURUSHITA; HINTON; KUMAR, 2005).

HSP60 é uma das moléculas de superfície melhor caracterizadas em *H. capsulatum*, a proteína imunodominante interage especificamente com o Receptor de Complemento CD11b/CD18 (CR3) em macrófagos, o que facilita a captação das células leveduriformes por esses fagócitos (LONG et al., 2003). O anticorpo quimérico IgG1, contendo a mesma região variável do MAb 4E12 parental, produzido nesse estudo, melhorou significativamente a capacidade fagocítica de macrófagos

diferenciados a partir da linhagem humana de monócitos Thp1, aumentando a fagocitose das leveduras de *H. capsulatum*, isolado G217B, e de *P. lutzii*, isolado Pb01. Guimarães e colaboradores já haviam demonstrado a eficiência na fagocitose de leveduras de Histoplasma opsonizadas com o MAb IgG2a (4E12) anti-HSP60 em comparação à fagocitose de leveduras não opsonizadas. O anticorpo monoclonal parental de origem murina melhorou significativamente a maturação fagossômica, aumentando a captação via Fc e morte das células fúngicas (GUIMARÃES et al., 2009). O MAb 4E12 também foi capaz de aumentar a fagocitose *in vitro* de leveduras opsonizadas de *P. lutzii* (THOMAZ et al., 2014).

Ensaio de reatividade por ELISA, utilizando o MAb4E12 (IgG2a) e o ch-MAb4E12 (IgG1) contra HSP60, confirmaram que ambos os anticorpos possuem características de ligação semelhantes, visto que possuem regiões variáveis idênticas. Houve, no entanto, uma perda de afinidade aparente do anticorpo quimérico em relação ao anticorpo monoclonal parental. Considerando que houve uma troca no isotipo do anticorpo após quimerização, diferenças no tamanho da região constante, nos processos de glicosilação, ou nas interações após a ligação ao antígeno, podem resultar em diferenças na avidéz e na formação de diferentes tipos de complexos antígeno-anticorpo. Diferenças na afinidade aparente e na especificidade fina têm sido descritas para MAbs com regiões variáveis idênticas, mas com diferentes subclasses de IgG [Revisado em (GUIMARÃES et al., 2011)]. A toxicidade de ch-MAb 4E12 também foi avaliada nesse trabalho, a análise foi feita por atividade mitocondrial pela redução de MTT e pela taxa de sobrevivência de larvas *G. mellonella* imunizadas, os resultados dos dois experimentos foram equiparáveis e mostraram toxicidade a partir da dose de 10 µg.

A troca isotópica do anticorpo, assim como um efeito citotóxico *in vivo*, são possíveis justificativas para um tratamento não efetivo com o aumento da dose administrada de ch-MAb 4E12 IgG1. Doses superiores foram bem toleradas por camundongos tratados com o anticorpo monoclonal parental MAb 4E12 IgG2a (GUIMARÃES et al., 2009; THOMAZ et al., 2014).

5.5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Uma questão crítica para utilização de MAbs de origem murina como terapia é a sua capacidade de gerar respostas imunes HAMA e de induzir reações adversas (HWANG; FOOTE, 2005). Nesse estudo utilizamos a tecnologia do DNA recombinante e engenharia de anticorpos para construir uma estrutura quimérica mais semelhante à humana sem perder as propriedades de ligação ao alvo, a partir do MAb anti-HSP60 de *H. capsulatum*, a fim de diminuir seu potencial imunogênico. Mesmo esse avanço sendo significativo, ainda se observa a presença de anticorpo anti-quimérico humano (do inglês Human Anti-Chimeric Antibody - HACA) em aproximadamente 40% dos pacientes (HWANG; FOOTE, 2005). Técnicas de humanização levaram a maior aprovação de anticorpos terapêuticos. Após confirmar que a reatividade da quimera com a chaperona se manteve, e com a obtenção de resultados promissores *in vitro* e *in vivo*, estuda-se a possibilidade da aplicação da técnica de Phage Display para seleção de fragmento Fd e da cadeia leve, sequências de CDR 3, amplificados a partir de RNA extraído do hibridoma produtor de 4E12 e expressos em *E. coli* XL1-Blue, e síntese de anticorpo humanizado.

6. CAPÍTULO III: Desenvolvimento de um sistema para interrupção de genes mediada por CRISPR/Cas9 aplicada à *Histoplasma capsulatum*

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 6.1.1.** Analisar o gene de hsp60 quanto a sequências alvo passíveis de edição gênica utilizando Sistema CRISPR/Cas9;
- 6.1.2.** Selecionar sequências promotoras e terminadoras de transcrição gênica adequadas ao modelo experimental;
- 6.1.3.** Construir Cassetes contendo o RNA quimérico ou a nuclease Cas9;
- 6.1.4.** Escolher um vetor esqueleto para clonagem dos insertos;

6.1.5. Testar o sistema por meio de transferência da região de tDNA do plasmídeo para células de *H. capsulatum* a partir de transformantes de *Agrobacterium tumefaciens*.

6.2. METODOLOGIA

6.2.1. Isolados fúngico e bacteriano

Foram utilizadas *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo Ti pAL4404 e *H. capsulatum* G217B.

6.2.2. Meios de cultivo

Colônias transformantes de *A. tumefaciens* foram mantidas em LB ágar. As colônias selecionadas foram cultivadas em Meio Mínimo para *Agrobacterium* ou em Meio de Indução, Meio Mínimo suplementado com ácido 4-morfolinoetanossulfônico (MES) 40 mM e acetosiringona 0.1 mM. O isolado *H. capsulatum* G217B foi cultivado em meio HAM'S F12 suplementado com HEPES 0,6% (Gibco – Life Technologies, USA) e SFB 10% (Atlanta biologicals, USA). O co-cultivo foi feito em Meio de Indução Ágar. Os transformantes de *H. capsulatum* foram mantidos em Ágar sangue. Os devidos agentes seletivos e demais condições de crescimento para cada etapa de transformação genética são descritos e detalhados nas subseções 6.2.11 e 6.2.12 mais à frente.

6.2.3. Escolha do *Protospacer* guia de RNA

6.2.3.1. Localização de sítios Motivo Adaptador Protospacer (PAM) na sequência da proteína HSP60

Na edição gênica pelo sistema CRISPR a nuclease Cas9 forma complexos com pequenos RNAs guias para clivagem do DNA em uma sequência alvo específica, a qual deve estar adjacente a um PAM. A sequência de bases componente da região PAM depende da variante de Cas9 escolhida para o sistema de edição. Para o presente trabalho, a nuclease inserida na construção foi a SpCas9, no caso, para que haja reconhecimento, o *Protospacer* deve ter uma sequência consenso NGG, na qual N pode ser qualquer nucleotídeo e G representa o nucleotídeo guanina. Uma sequência de 20 bases nitrogenadas é suficiente para compor o RNA guia para que haja ligação por complementaridade, a presença do PAM permite a dupla clivagem da cadeia de DNA.

O primeiro passo foi encontrar a sequência completa, incluindo *exons* e *introns*, do gene *HSP60* que codifica para a chaperona, ou Proteína de Choque Térmico 60, de *Histoplasma capsulatum*. O banco de dados utilizado foi o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), pela ferramenta de busca de nucleotídeos no formato *Genbank*. A sequência foi convertida para formato FASTA e analisada no Software SnapGene. Nessa etapa foram rastreadas todas as possíveis sequências PAM, sendo encontradas 22 regiões no sentido 5'-3'. Foram excluídos motivos *protospacer* que apresentaram dupla de guaninas repetidas na sequência adjacente, a fim de evitar possíveis erros. O PAM com melhor localização genômica foi selecionado na posição 122 do gene (Figura 32). O sítio para edição direcionada não deve estar localizado muito no início ou no fim do gene, a fim de evitar a possibilidade de expressão de sequência de aminoácidos ainda funcional. No entanto, é vantajoso que o guia de homologia esteja numa posição onde qualquer mutação bloqueie o início da tradução.

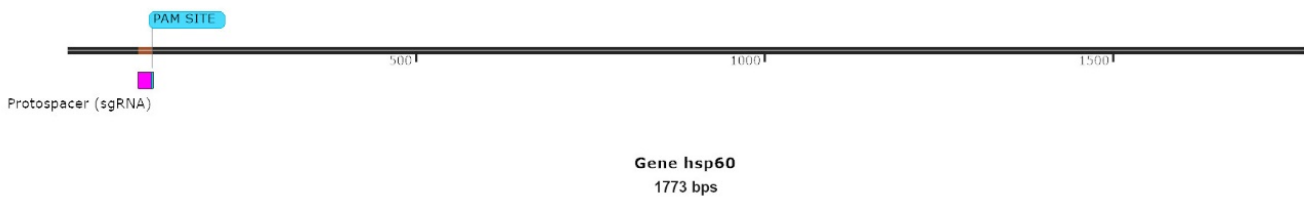


Figura 32. Seleção de sequência para RNA espaçador no gene *HSP60*.

Após escolha de sítio PAM constituído pela sequência de bases AGG, a sequência adjacente de 20 nucleotídeos foi selecionada para a função de RNA guia à região complementar no genoma do *H. capsulatum*.

6.2.3.2. Análise de alinhamento em regiões de similaridade utilizando a ferramenta BLAST

A sequência alvo com 20 bases nitrogenadas (Query), escolhida com base no PAM, foi rastreada nos isolados de *H. capsulatum* e investigada quanto à sua singularidade, analisando o alinhamento com as ocorrências encontradas (Subject), a orientação e a porcentagem de identidade. É importante que a sequência completa (20 bps *Query*: 20 bps *Subject*), com 100% de identidade (sem *gaps*), coincida apenas uma vez (1 *hit*), para que o RNA guia direcione a nuclease Cas9 ao sítio correto de edição.

As análises foram feitas com algoritmo BLAST nos Bancos de Dados *Ensembl Fungi* e NCBI. Além do rastreamento intraespécie, foram feitas pesquisas por similaridade entre o Query retirado da *HSP60* de *H. capsulatum* e a sequência gênica de *hsp60* dos isolados Pb18 e Pb01 do gênero *Paracoccidioides*. A sequência completa do gene para *HSP60* também foi comparada por BLAST com outras espécies fúngicas do filo Ascomycota.

6.2.4. Construção do Cassete de RNA guia Híbrido

O Cassete de RNA guia Híbrido consiste no sgRNA flanqueado por uma ribozima Hammerhead (HH) e pela ribozima do vírus Delta Hepático (VDH), que permitem a autoexcisão do sgRNA a partir do transcrito (Figura 33), expresso sob o controle do promotor *gpdA* e do terminador *trpC* de *Aspergillus Nidulans*. A ribozima HH é um dos vários RNAs catalíticos conhecidos por ocorrer na natureza, e tem sido utilizada de forma experimental como um sistema direcionado de clivagem de RNA. Para que ocorra a excisão do sgRNA é necessário que a extremidade 5' da ribozima HH se emparelhe com as bases no início do espaçador. Foram inseridas então duas trincas de bases complementares adjacentes à ribozima gerando uma região de repetição invertida (Figura 34).

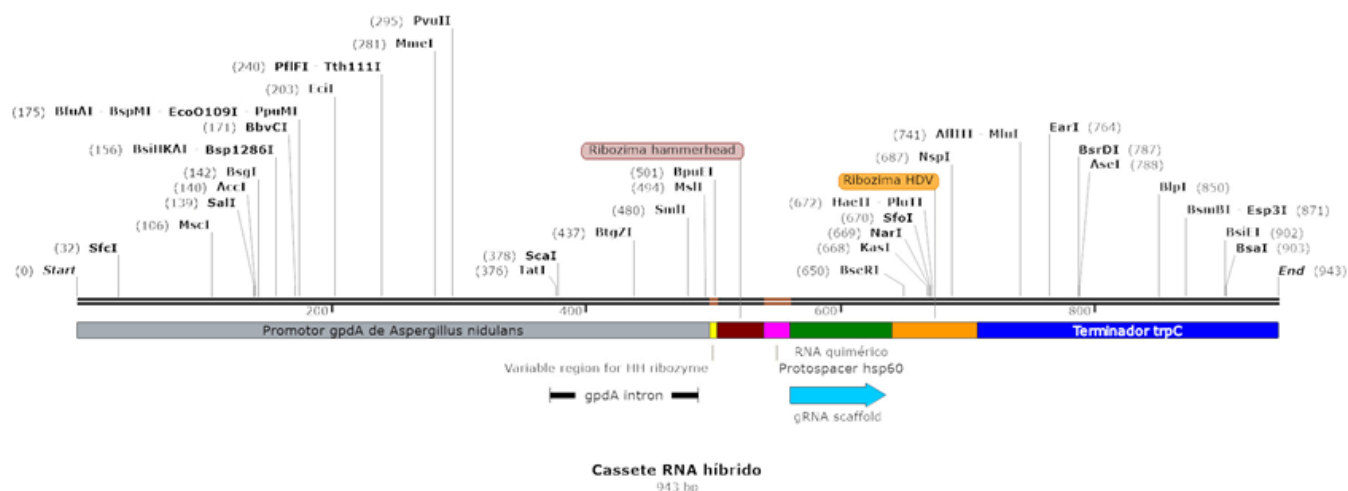


Figura 33. Construção do Cassete de RNA guia Híbrido.

O RNA guia, composto pelo RNA espaçador e pelo RNA quimérico, é flanqueado por ribozimas. A transcrição ocorre sob controle de genes regulatórios provenientes de *A. Nidulans*. As sequências dos componentes estão separadas por cores: **Cinza:** Promotor *gpdA*; **Vinho:** Ribozima HH; **Rosa:** Protospacer de 20 nucleotídeos; **Verde escuro:** RNA Quimérico; **Laranja:** Ribozima VDH. **Azul:** Terminador *trpC*.

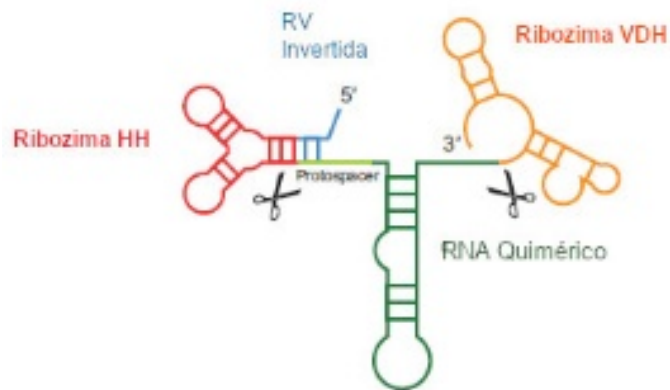


Figura 34. Autoexcisão do RNA guia por ribozimas.

Os transcritos primários contendo sequências de ribozimas flanqueadoras são autoexcisados para gerar sgRNAs que direcionem a clivagem de Cas9 aos locais complementares no genoma. As sequências dos componentes estão separadas por cores: **Azul:** Região Variável Invertida Complementar ao Protospacer; **Vermelho:** Ribozima HH; **Verde claro:** Protospacer de 20 nucleotídeos; **Verde:** RNA Quimérico; **Laranja:** Ribozima VDH.

O RNA guia é um RNA sintético curto composto pela sequência espaçadora de 20 pares de bases, que define o alvo genômico a ser modificado, e por uma sequência de scaffold, uma espécie de âncora, necessária para a ligação da enzima Cas9. O RNA scaffold também é definido pela escolha da variante Cas9. A sequência adicionada ao final 3' da sequência alvo foi o RNA scaffold para sistema CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (5'GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTG AAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC3'). A sequência corresponde a uma quimera formada pelo crRNA combinado ao tracrRNA, de *S. pyogenes*, que guiam e ativam a nuclease Cas9. As sequências para controle da expressão gênica desse Cassete foram retiradas da Base de Dados para Genoma de *Aspergillus* (AspGD). São regiões regulatórias de *A. nidulans*, promotor *gpdA/AN8041* e terminador *trpC/AN0648*.

6.2.5. Construção do Cassete para a Enzima de Restrição Cas9

A endonuclease Cas9 de *S. pyogenes* pode ser direcionada para um loci genômico específico pelo sgRNA, onde forma um complexo. A estrutura cristalina possui dois lobos, um lobo de reconhecimento, essencial para a ligação sgRNA e DNA alvo, e um lobo de nuclease contendo os domínios HNH e RuvC. O domínio HNH está posicionado para a clivagem da cadeia complementar ao RNA espaçador enquanto o domínio RuvC cliva a cadeia não complementar. O lobo da nuclease também contém um domínio carboxi-terminal responsável pela interação com o PAM (Figura 35).

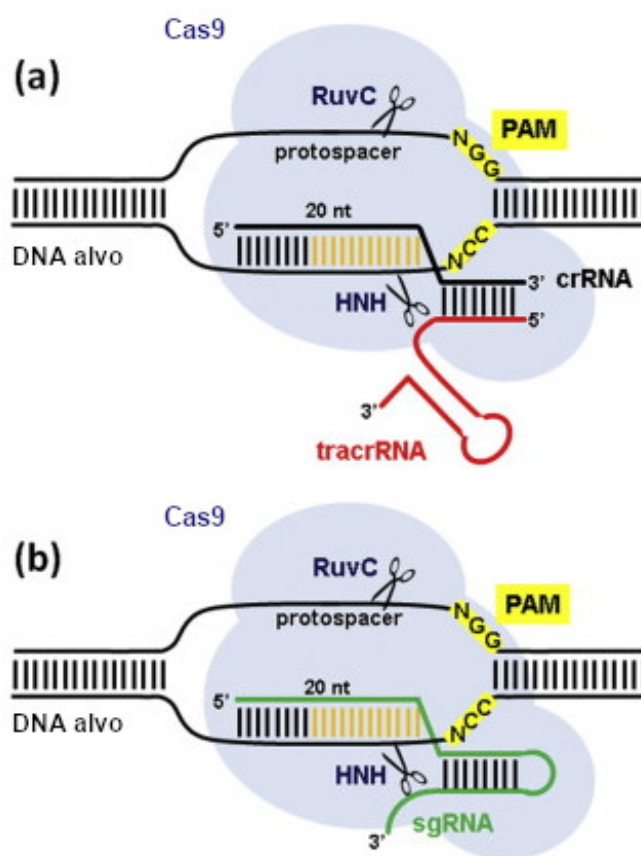


Figura 35. Clivagem por Cas9 guiada por RNA.

Cas9 forma um complexo bilobular com o sgRNA e a sequência do DNA alvo. A nuclease faz a dupla clivagem da cadeia de DNA alvo usando os domínios RuvC e HNH. (A) Sistema nativo: Cas9 é guiada por uma estrutura formada pelo crRNA, contendo a sequência de 20 bps complementar à região alvo específica, e pelo tracrRNA, que estabiliza a estrutura e ativa a nuclease. (B) Sistema reprogramado: O RNA quimérico (resultado da fusão da extremidade 3' do crRNA com a extremidade 5' do tracrRNA) ancora a Cas9 por meio da interação com a sequência PAM, o RNA espaçador se liga por complementaridade com o DNA alvo. Azul: Representação da

estrutura cristalina da Cas9; Verde: sgRNA (tracrRNA em vermelho + crRNA em preto); Laranja: Sequência de 12 bps à montante do PAM (região crítica para emparelhamento).

O *design* do Cassete para Cas9 consiste na sequência codante para a endonuclease Cas9 seguido pelo NLS sv40 na extremidade 3'. O NLS sv40 é um sinal de transporte para importação de proteínas nucleares. A expressão gênica das sequências é regulada pelo Promotor Ptef e pelo Terminador Ttef. O Cassete ainda compreende o gene marcador de seleção para Higromicina (hph), regulado pelo Promotor Ptrpc (Figura 36).

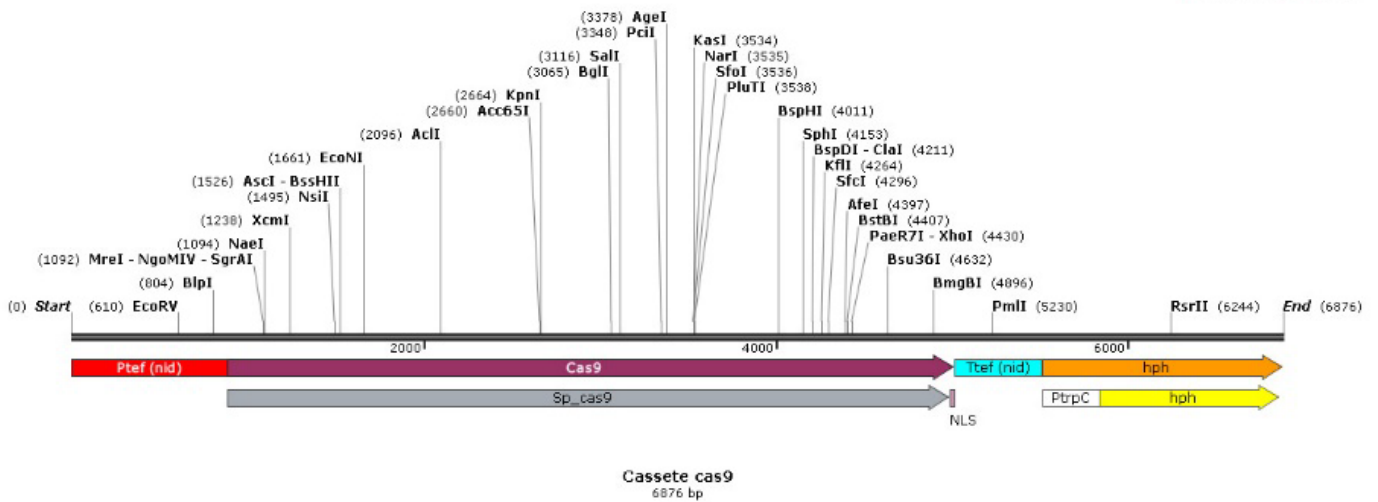


Figura 36. Construção do Cassete de Cas9.

A transcrição da nuclease CAS9 de *S. pyogenes* ocorre sob regulação do promotor tef e do terminador tef. A sequência sinal NLS, necessária para o transporte da enzima até o núcleo, se localiza na terminação 3' do gene de Cas9. O Cassete também é composto pelo gene para Higromicina, antibiótico de seleção para transformantes de *H. capsulatum* que incorporarem o tDNA após transferência. As sequências dos componentes estão separadas por cores: **Vermelho:** Promotor tef; **Lilás:** Gene Cas9; **Rosa:** Sequência de Localização Nuclear (NLS); **Azul:** Terminador tef; **Branco:** Promotor trpC para gene da Higromicina. **Amarelo:** Gene da Higromicina.

6.2.6. Escolha do vetor esqueleto para clonagem dos insertos

A transformação genética mediada por *A. tumefaciens* se caracteriza pela introdução de uma sequência específica de genes em uma célula receptora. Esse fenômeno é possível devido à presença de um plasmídeo que infecta naturalmente essas bactérias, conhecido como Plasmídeo Indutor de Tumor (plasmídeo Ti). O plasmídeo Ti possui genes que codificam para funções relacionadas com a transferência e integração de sequências da região tDNA, localizadas entre a borda direita e a borda esquerda de um plasmídeo binário. O isolado LBA4404 foi aqui utilizado por conter um plasmídeo Ti desarmado, ou seja, um plasmídeo que teve os genes do tDNA integrado, que codificariam proteínas naturais da bactéria, deletados. Dessa forma torna-se possível a exportação do tDNA de interesse, contido no vetor construído por engenharia genética e transformado na bactéria.

Conforme estratégia de transferência de genes, foi selecionado um vetor binário para a clonagem do Cassete de sgRNA e do Cassete de Cas9. O vetor pSIM24 KanR (#67583) foi adquirido da empresa Addgene, Massachusetts/USA, para ser utilizado como vetor esqueleto. O plasmídeo contém sequências repetidas nas extremidades direita (RB – do inglês Right Border) e esquerda (LB – do inglês Left Border) que delimitam uma fronteira, as repetições são reconhecidas por complexos proteicos de virulência expressos pelo plasmídeo Ti, o que o torna ideal para transformações mediadas por *A. Tumefaciens* (Figura 37). Os sítios de inserção (FspAI; Stul; TspMI; BstZ171) são únicos no plasmídeo ou no Sítio Múltiplo de Clonagem (SMC), e foram escolhidos de forma que os dois Cassetes pudessem ser subclonados de maneira independente e ainda estar próximos.

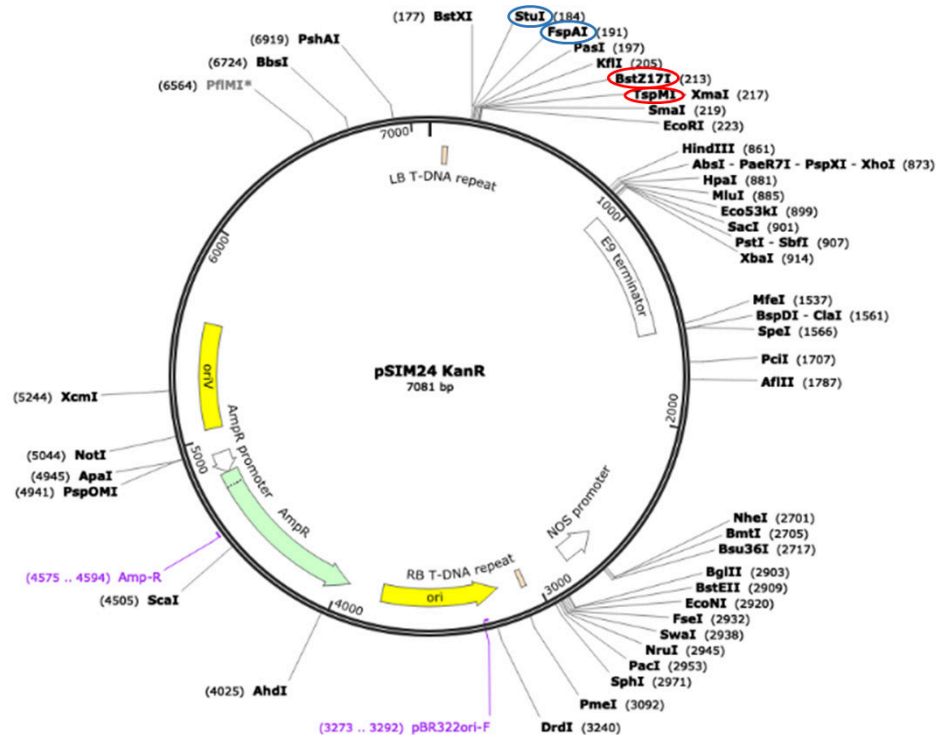


Figura 37. Vetor esqueleto para expressão gênica.

O vetor pSIM24 KanR, adquirido pela Addgene, é um plasmídeo binário com 7081 bps que contém sequências repetidas na borda direita e na borda esquerda. Os SMC estão entre as repetições RB e LB no tDNA. O Cassete de Cas9 foi inserido entre o sítio para enzima de restrição FspAI e o sítio para enzima StuI (destacados em azul), o Cassete de sgRNA foi inserido entre o sítio para enzima TspMI e o sítio para BstZ171 (destacados em vermelho). O vetor contém o gene marcador de seleção para Ampicilina para transformação em bactérias. A origem da replicação (gene ori) se encontra adjacente à sequência RB, determinando que a replicação se inicie nessa região.

6.2.7. Nova Construção Plasmidial para Sistema CRISPR/Cas9

Os insertos dos Cassetes para sgRNA e Cas9 foram clonados no plasmídeo pSIM KanR pela empresa GenScript, USA. A Nova Construção, tendo como alvo a sequência codante para HSP60, foi projetada para modificar geneticamente leveduras de *H. capsulatum*.

6.2.8. Eletroporação de *A. tumefaciens*

O Sistema de ligação binário (1 µl) foi adicionado, e misturado gentilmente, a 20 µl de células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* LBA4404. Paralelamente, uma cubeta de eletroporação de 0,1 cm (Bio-Rad) foi resfriada em gelo. A amostra foi transferida para a cubeta de eletroporação para receber eletropulso. Os parâmetros foram definidos para 25 µF, 200 Ω e 2,5 kV. Meio SOC (1 mL) foi adicionado imediatamente após o pulso. As células eletroporadas foram transferidas para um tubo fálcon de 15 mL e incubadas por 1 hora a 30°C, sob agitação de 100 rpm. Volumes de 20, 50 e 100 µL dos transformantes foram cultivados à temperatura ambiente, por 3 dias, em placas LB contendo glicose 0,1%, ampicilina 100 µg/mL (Sigma, St. Louis/MO), e espectinomicina 100 µg/mL, agente seletivo para manutenção do plasmídeo Ti. Após crescimento de colônias, a propagação foi feita seguindo as especificações do QIAprep Miniprep kit. As amostras de DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose.

6.2.9. Transformação de isolados de *E.coli*

DNA plasmidial (1 µL/reação) extraído das células de *A. tumefaciens* e propagado por Mini Preparação (QIAprep Miniprep kit - QIAGEN, USA) foi adicionado a 25 µL de células Neb 5 alpha ou a 25 µL de células TOP 10 termocompetentes, e incubado em gelo por 30 minutos. As reações foram submetidas à choque térmico e as amostras plaqueadas, conforme descrito na subseção 5.2.4. Uma colônia de cada transformante foi inoculada em 5 mL de Caldo LB com ampicilina 100 µg/mL (Sigma, St. Louis/MO) para obtenção de maior quantidade de DNA por Mini Preparação.

6.2.10. Digestão dupla para confirmação dos insertos

Para confirmar a localização e tamanho do Cassete de RNA guia híbrido, amostras contendo 600 ng da nova construção plasmidial, propagadas a partir de LBA4404, TOP 10, ou Neb 5 alpha, foram digeridas com 0,5 µL das enzimas TspMI e BstZ171 em tampão CutSmart 1X (New England Biolabs, USA), numa reação de volume final 10 µl. A localização e tamanho do Cassete de Cas9 foram confirmados

pela digestão de 600 ng de DNA com as enzimas FspAI e Stul (2:1) em tampão TANGO 1X (Thermo Scientific, USA). A proporção das enzimas foi correlacionada à sua eficiência no respectivo tampão. As incubações foram feitas a 37°C por 2h. As amostras foram preparadas em tampão de carregamento 6X concentrado, à base dos corantes Azul de bromofenol e Xileno cianol, para final 1X, e aplicadas em gel de agarose 1% em TBE 1X acrescido do corante Brometo de Etídeo 0,5 µg/mL. As bandas foram visualizadas sob luz UV.

6.2.11. Co-cultivo de leveduras de *Histoplasma* e células de *Agrobacterium* eletrotransformadas

Dois dias antes do preparo para co-cultivo, uma colônia dos eletrotransformantes foi semeada em 5 mL de Meio Mínimo de *Agrobacterium* contendo ampicilina (Sigma, St. Louis/MO) e espectinomicina (100 µg/ mL cada) e cultivada overnight, sob agitação, a 30°C. Após cultivo, foi feita leitura da DO em comprimento de onda de 600 nm. A cultura foi diluída para Abs 600 nm de 0,05 em Meio de Indução suplementado com 200 µM de acetosiringona (composto fenólico naturalmente encontrado em plantas, capaz de ativar os genes vir do plasmídeo Ti responsáveis pela transferência do tDNA) e cultivada overnight, sob agitação, a 30°C.

Volumes de 100 µl contendo células de *Agrobacterium* transformadas, coletados de cultura com DO de 0,6, foram misturados a volumes de 100 µl de células leveduriformes de *H. capsulatum* G217B (1x10⁷ células) coletados de Meio HAM'S F12 (com HEPES 0,6% e SFB 10%) cultivado em paralelo, após 3 dias de crescimento. As misturas de co-cultura (2:1; 1:1; ou 1:2) foram espalhadas em membranas de nylon, Amersham Hybond-N+ (GE Healthcare Life Sciences, USA), e colocadas em placas sobre o Meio de Indução Ágar contendo 200 µM de acetosiringona. As membranas de nylon são carregadas positivamente, o que aumenta a capacidade de ligação e transferência de ácidos nucleicos.

6.2.12. Seleção de transformantes de *H. capsulatum*

Após 3 dias de crescimento, à 30°C, as membranas foram transferidas para placas de Meio de Indução Ágar contendo cefotaxima 200 µM e 25 µg/mL de Higromicina B, a fim de selecionar apenas as células de G217B contendo o tDNA transferido a partir dos transformantes LBA4404. A seleção foi feita por 3 semanas, com trocas para meio novo a cada 3 dias, a 30°C.

6.2.13. Mudança de morfologia

Os micélios transformantes foram transferidos, após seleção, para Ágar BHI suplementado com sangue de carneiro à 5%, cisteína 1%, e Higromicina, para manutenção e futuro uso experimental. As placas de cultura foram colocadas à 37°C para transição morfológica de *H. capsulatum* para sua forma leveduriforme. Colônias resistentes à Higromicina foram repicadas em Meio HAM'S F12 para estocagem em glicerol.

6.3. RESULTADOS

6.3.13. Análise por BLAST para validação da sequência alvo

O RNA espaçador, constituído por sequência de 20 bases nitrogenadas complementares à região alvo no gene *hsp60* (Query), foi rastreado quanto ao alinhamento no genoma de *H. capsulatum* utilizando a ferramenta BLAST a fim de diminuir a possibilidade de mutações indesejadas. O rastreamento foi feito em 5 diferentes isolados de *H. capsulatum*, G186AR, H88, H143, Nam1 e G217B. Todas as análises mostraram apenas 1 correspondência (hit) apresentando alinhamento completo e 100% de identidade com subject encontrado em gene para HSP60. Não foi encontrada equivalência entre query e subject em pesquisa feita no genoma dos isolados Pb01 e Pb18 do gênero *Paracoccidioides* (Tabela 4).

Rastreamento da sequência completa do gene para HSP60 proveniente de *H. capsulatum* por BLAST contra o genoma de outras espécies fúngicas do filo Ascomycota mostrou similaridade de 89% com o gene encontrado em *A. nidulans*, indicando que a estratégia e as sequências regulatórias utilizadas para modificações genéticas possuem grandes chances de serem compartilhadas de maneira eficiente entre as espécies. As comparações mostraram 75% de correspondência entre o gene hsp60 de Histoplasma e os genes de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.

Tabela 4. Número de ocorrências encontradas para o alinhamento em regiões do genoma de isolados fúngicos com a sequência alvo de 20 nt selecionada no gene hsp60 de *H. capsulatum*.

O score de alinhamento com o Query mostra correspondência total, com 100% de identidade, entre a sequência de 20 bases nitrogenadas analisada e apenas um segmento encontrado no gene hsp60 dentre as regiões genômicas rastreadas por isolado.

ISOLADO	QUANTIDADE DE HITS	SCORE DE ALINHAMENTO COM QUERY	GENE ONDE HOUE 100% DE IDENTIDADE ENTRE QUERY E SUBJECT
G186AR	1	20	
	1	19	
	1	15	HCBG-08832
	1	14	Proteína HSP60-like
	3	13	
	6	12	
H88	1	20	
	1	19	
	1	15	HCEG-07440
	1	14	Proteína HSP60-like
	3	13	
H143	1	20	
	1	19	
	1	15	HCDG-05076
	1	13	Proteína HSP60-like
Nam1	1	20	
	1	15	
	7	13	HCAG-06961
	8	12	Proteína HSP60-like
G217B	1	20	
	1	12	
	6	11	Proteína HSP60-like
	11	10	
	76	9	
Pb01	2	13	
	5	12	
Pb18	1	15	
	1	14	
	3	13	
	4	12	

6.3.14. Clonagem no vetor pSIM24 KanR dos Cassetes projetados para edição do gene *hsp60*

O vetor pSIM24 KanR foi comprado da companhia Addgene e enviado para a empresa Genscript. Os insertos foram clonados na região de tDNA do vetor binário, entre as sequências repetidas flanqueadoras da borda direita e da borda esquerda, e orientadas nesse sentido. As técnicas de clonagem utilizadas foram PCR com Kit Clone-EZ, Mutagênese Sítio Dirigida e Reação com enzima ligase. Os fragmentos foram inseridos entre os sítios para as enzimas *FspAI* e *StuI* (Cassete Cas9) e entre os sítios *TspMI* e *BstZ17I* (Cassete sgRNA híbrido) (Figura 38). A Nova Construção foi verificada por sequenciamento.

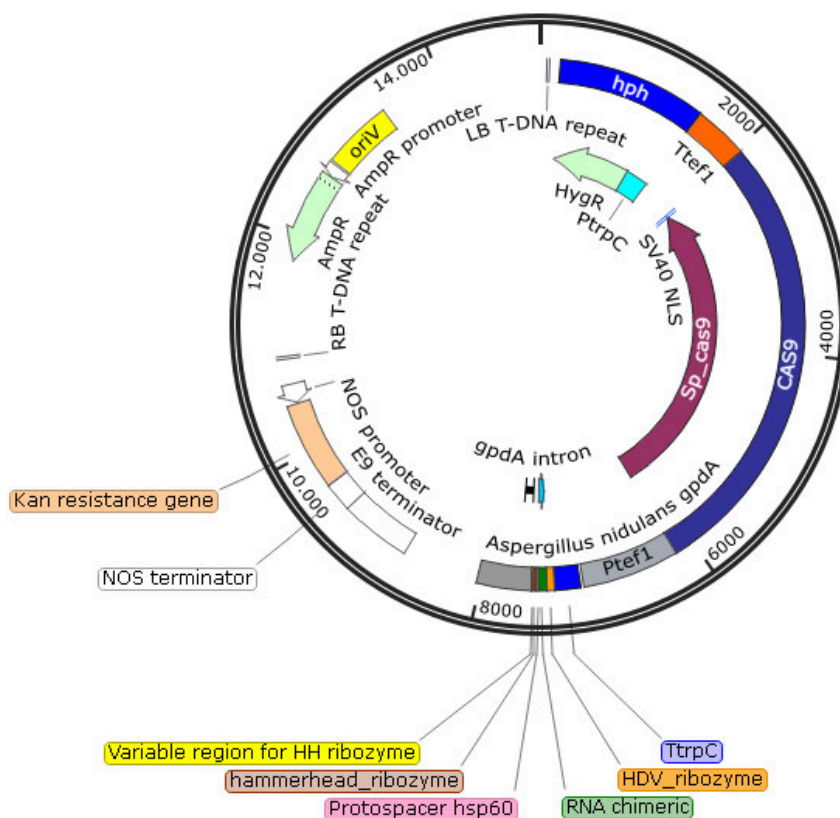


Figura 38. Nova construção Plasmidial para Sistema CRISPR/Cas9. Vetor pSIM24 KanR após clonagem dos novos fragmentos.

6.3.15. Confirmação da transformação genética de células bacterianas e da inserção dos Cassetes nos sítios de clonagem

Geralmente, a eficiência de transformação é baixa em *A. tumefaciens*, com frequência as amostras de DNA plasmidial extraídas de suas células possuem muitas impurezas. Devido à dificuldade em se verificar os insertos após transformação em estirpes de *Agrobacterium*, é possível confirmar a presença do vetor eletroporado nessas células utilizando suas amostras de DNA, obtidas após Minipreparação, para transformar células termocompetentes.

O crescimento de colônias de LBA4404 em meio contendo os agentes de seleção para o plasmídeo inserido por eletroporação e para o plasmídeo Ti indicaram eficiência no processo de transformação. Colônias foram lisadas para extração do DNA e a eletroforese em gel de agarose confirmou a presença do plasmídeo nas células de *A. tumefaciens*, após concentração das amostras (Figura 39). As mesmas amostras foram utilizadas para transformação por choque térmico em células TOP10 e células Neb 5 alpha, o tamanho e a localização dos insertos no vetor binário foram confirmados após clivagem com enzimas de restrição nos sítios de clonagem (Figura 40).

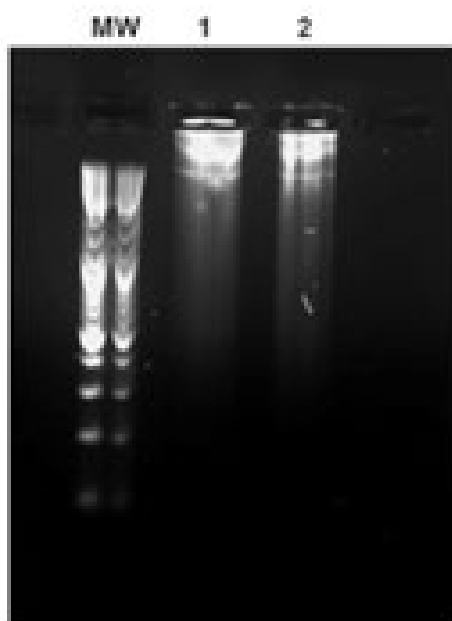


Figura 39. Confirmação da transformação de *A. tumefaciens* com a Nova Construção Plasmidial.

Os poços 1 e 2 mostram bandas dos plasmídeos extraídos de células LBA4404 eletrocompetentes obtidas de diferentes colônias. MW: DNA Ladder 1Kb Fisher Scientific.

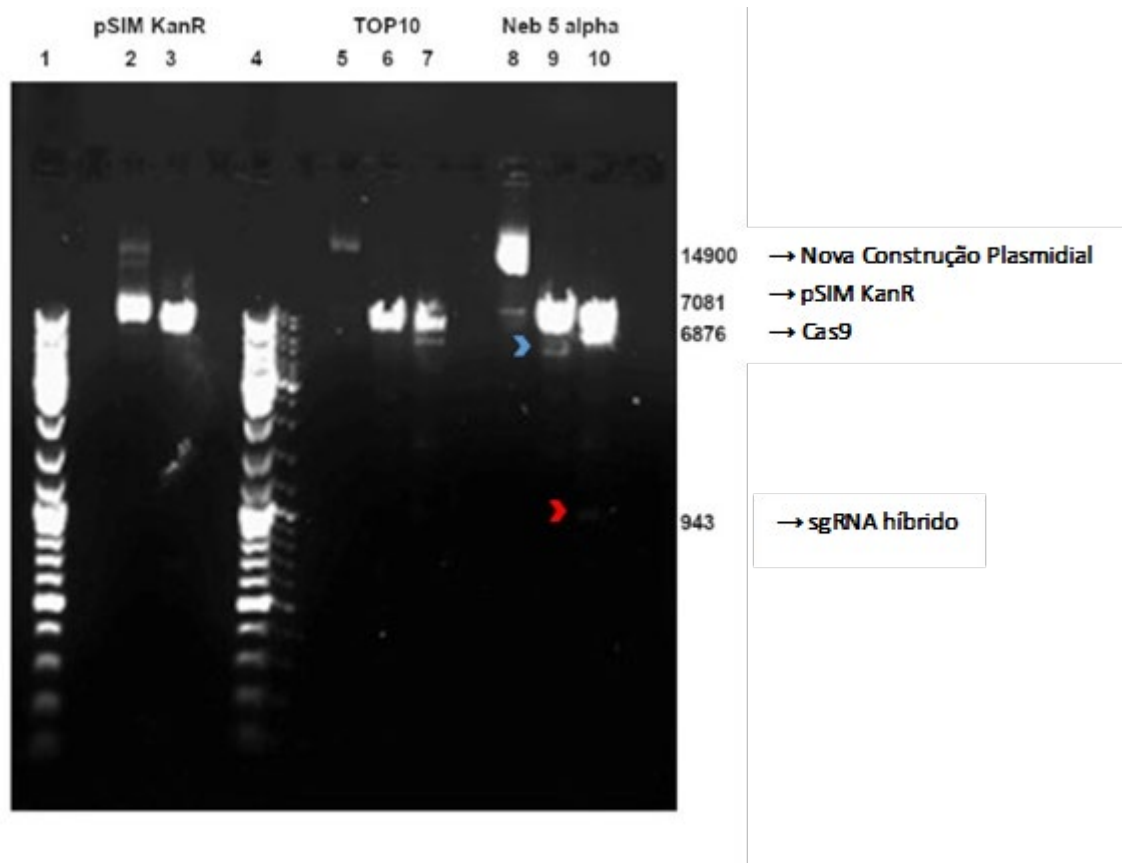


Figura 40. Confirmação de insertos após transformação em células termocompetentes com Nova Construção Plasmidial extraída de eletrotransformantes LBA4404.

As amostras de DNA mais limpas foram obtidas após Minipreparação de colônias de Neb 5 alpha. O tamanho e localização dos Cassetes foram confirmados por digestão dupla. Vetor Esqueleto pSIM KanR: (2) Vetor intacto (3) Vetor linearizado. Nova Construção extraída de células TOP10. (5) Vetor intacto. (6) Digestão dupla com FspAI e Stul (7) Digestão dupla com TspMI e BstZ171. Nova Construção extraída de células Neb 5 alpha. (8) Vetor intacto. (9) Digestão dupla com FspAI e Stul (10) Digestão dupla com TspMI e BstZ171. MW (1 e 4): DNA Ladder 1Kb Fisher Scientific. Nova Construção Plasmidial: 14900 bps; pSIM KanR: 7081 bps; Cassete Cas9: 6876 bps; Cassete RNA híbrido: 943 bps.

6.3.16. Seleção de clones transformados

Após co-cultivo de células LBA4404 eletrotransformadas e de células do isolado G217B, as membranas contendo a co-cultura foram transferidas para meio contendo cefotaxima, agente bacteriostático para *A. tumefaciens*, e Higromicina B para selecionar células fúngicas contendo o tDNA. Após 3 semanas de seleção verificou-se, macroscopicamente e microscopicamente, apenas o crescimento de micélios. A conversão foi feita para leveduras em meio contendo Higromicina B e temperatura de 37°C.

A utilização de meio seletivo para *H. capsulatum* contendo o vetor com a sequência de CAS9 permitiu o isolamento das leveduras transformadas e confirmou a eficiência da técnica de transformação mediada por *A. tumefaciens*.

6.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A proteína HSP60 de *H. capsulatum* também foi utilizada como alvo para edição gênica, durante o desenvolvimento desse projeto, utilizando o sistema CRISPR como um dos métodos para caracterização de antígenos. A manipulação genética evoluiu nos últimos anos, e a tecnologia CRISPR foi implementada com sucesso em diferentes fungos patogênicos humanos, como *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp. (ROMÁN et al., 2019). O sistema CRISPR foi implementado pela primeira vez para *C. albicans* por Vyas e colaboradores, o método se baseia na expressão da sequência de Cas9 fundida ao peptídeo sinal de localização nuclear SV40, sob controle do promotor ENO1, e do sgRNA sob controle do promotor SNR52 RNA pol III. A desvantagem do método apresentado é a dependência da integração genômica das sequências expressas no locus para ENO1 (VYAS; BARRASA; FINK, 2015). Para evitar problemas de toxicidade, um novo conjunto de vetores otimizados para mutagênese em *C. albicans* foi desenvolvido (VYAS et al., 2018). Nesses plasmídeos o cassete Cas9 é integrado em uma região intergênica neutra (NEUT5L), sendo clivado por Flipases (FLP) flanqueadoras (GERAMI-NEJAD et al., 2013). Vários grupos de pesquisa têm trabalhado na adaptação da tecnologia CRISPR/Cas9 para compreender os mecanismos de virulência da espécie *C. auris*, um patógeno

emergente associado a infecções multirresistentes em diversos países (ROMÁN et al., 2019).

Wang e colaboradores descreveram a utilização do sistema CRISPR/Cas9 para mutação por indels em sequências alvo de *C. Neoformans*, com alta eficiência nas taxas de recombinação homóloga. O grupo trabalhou em um sistema capaz de eliminar todos os seus componentes espontaneamente, após direcionamento da nuclease e edição do alvo, construindo o cassete Cas9 em um arranjo cis. Essa degradação diminui os riscos de mutação off target e de citotoxicidade (WANG et al., 2016b). O grupo de Arras também desenvolveu um sistema para edição de *C. neoformans*, no qual o Cas9 é integrado de maneira estável no genoma e os sgRNAs são transitoriamente expressos, adicionando genes de ribozimas às extremidades do sgRNA para sua auto-clivagem (ARRAS et al., 2016). Fan e colaboradores validaram o sistema CRISPR-CAS9 transitório acoplado a eletroporação (TRACE) em *C. neoformans*, constituído por três cassetes independentes (Cas9, sgRNA e Doador de DNA) (FAN; LIN, 2018).

No caso de fungos filamentosos, para os quais as ferramentas genéticas são pouco disponíveis, a aplicação do sistema CRISPR aumentou muito a capacidade de manipulação dos genomas (ROMÁN et al., 2019). Em 2015, o grupo de Mortensen desenvolveu um sistema simples para engenharia genética baseado no método de CRISPR/CAS9 que pode ser utilizado para um amplo espectro de fungos, com expressão transitória do sgRNA sob controle de um forte promotor constitutivo (NØDVIG et al., 2015). Fuller e colaboradores foram os primeiros a desenvolver um sistema CRISPR/CAS9 de alta eficiência para mutação de genes no patógeno humano *A. fumigatus*, utilizando o gene *pkpP* (codante para a enzima Polyketide Synthase) como alvo de estudo nas suas diferentes funções, como a biosíntese de pigmento conidial e virulência (FULLER et al., 2015). Seguindo a mesma abordagem, Zhang e colaboradores tiveram sucesso na mutagênese de múltiplos locus em uma única etapa de transformação de células de *A. fumigatus* (ZHANG et al., 2016).

A estratégia de edição de genes por sistema CRISPR facilita o amplo rastreamento genômico, o desenvolvimento e aplicação dessa metodologia para uma gama maior de fungos pode ser essencial para a análise de seus mecanismos de patogenicidade e, conseqüentemente, para a descoberta de novos alvos levando ao

desenvolvimento de novas terapias antifúngicas. Como diversos trabalhos têm mostrado, diferentes abordagens para adequar o sistema CRISPR/Cas9 às espécies fúngicas podem ser necessárias. No presente estudo, desenvolvemos um sistema de edição genética para *H. capsulatum*, adaptado a partir do método aplicado para *Blastomyces dermatitidis* por Kujoth e colaboradores (KUJOTH et al., 2018). *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* são fungos dimórficos causadores de infecções respiratórias autolimitadas que apresentam manifestações clínicas muito semelhantes (POUNDER; HANSEN; WOODS, 2006). Essas espécies fúngicas possuem forma teleomórfica, fase sexual meiospórica, pertencente ao gênero *Ajellomyces* (IMANO, 2005). Detecção de antígenos como teste diagnóstico mostra reatividade cruzada entre *H. capsulatum* e *B. dermatitidis* próxima de 90%, sendo as técnicas moleculares as mais indicadas para diferenciação desses fungos (BABADY et al., 2011). A escolha do método, portanto, foi baseada em similaridades das espécies.

Nesse trabalho foram utilizadas três plataformas de manipulação genética e engenharia de proteínas para o rastreamento de antígenos e análise de novas ferramentas imunoterápicas para o tratamento de PCM e Histoplasmose, a construção de vetores para vacina de DNA, síntese de anticorpo quimérico e um sistema de edição gênica CRISPR/Cas9. A ferramenta CRISPR desenvolvida ainda se encontra em fase experimental inicial. Os testes com a quimera apresentaram resultados mais promissores quando comparados à vacina de DNA. As proteínas alvo extraídas das espécies de Paracoccidioides, no entanto, ainda precisam ser analisadas quanto ao seu potencial antigênico.

6.5. PERSPECTIVAS FUTURAS

A fim de entender melhor a importância do antígeno HSP60 na patogênese da Histoplasmose, as leveduras de *H. capsulatum* transformadas geneticamente utilizando o sistema CRISPR/Cas9 serão lisadas para extração do DNA genômico e sequenciamento. Após confirmação de mutação na sequência alvo, serão feitos testes *in vitro* e *in vivo* para estudos de perda de função e virulência.

7. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES FINAIS

As micoses sistêmicas estão associadas a taxas crescentes de morbimortalidade devido à toxicidade de vários compostos e ao aumento no número de pacientes imunossuprimidos, considerando que uma resposta imune eficiente é essencial para impedir o progresso da infecção fúngica (ALVES PARENTE-ROCHA et al., 2017). O surgimento de linhagens resistentes aos antifúngicos atuais e semelhanças entre células fúngicas e células humanas também são um desafio, evidenciando a necessidade da identificação de novos alvos terapêuticos e da elucidação de mecanismos de virulência e escape (SCORZONI et al., 2017). Outra desvantagem das terapias usuais, como sulfonamidas, polienos, azóis e equinocandinas, é a duração do tratamento que pode chegar até 2 anos (ALVES PARENTE-ROCHA et al., 2017), sabendo que muitos pacientes apresentam sequelas ou recaídas.

Uma nova abordagem para profilaxia e tratamento de doenças fúngicas é a imunoterapia, envolvendo estratégias que incluem a manipulação genética ou a engenharia de proteínas para produção de citocinas, peptídeos e anticorpos com fins vacinais, para a ativação de resposta humoral ou celular do hospedeiro, ou visando a neutralização de moléculas antigênicas importantes ou essenciais à patogênese desencadeada pelo agente infeccioso [revisado em (CASADEVALL; PIROFSKI, 2001; NAMI et al., 2019)]. O desenvolvimento de sistemas vacinais seguros e eficazes contra fungos patogênicos ainda representa um desafio devido à necessidade de uma maior compreensão acerca da interação patógeno-hospedeiro e em como essa relação afeta a resposta imunológica (NANJAPPA; KLEIN, 2014). Vários estudos que buscam uma redução no tempo de terapia e o restabelecimento de uma resposta imune protetora têm sido conduzidos com micoses causadas por *Aspergillus* spp. (STEVENS; CLEMONS; LIU, 2011), *Candida* spp. (PIETRELLA et al., 2010), *B. Dermatitidis* (WANG et al., 2016a), *Cryptococcus* spp. (CHATURVEDI et al., 2014), *Coccidioides* spp. (HUNG et al., 2012), *H. capsulatum* (WÜTHRICH et al., 2011), *Microsporium canis* (CAMBIER et al., 2015), *Paracoccidioides* spp. (PINTO et al., 2000; AMARAL et al., 2010; OLIVEIRA; COELHO, 2017), *Pneumocystis jirovecii*

(SAMUELSON et al., 2016), *Sporothrix* spp. (JR et al., 2015) e *Talaromyces marneffeii* (WONG et al., 2002).

Anticorpos com fins terapêuticos também têm sido investigados, não havendo no entanto anticorpos com ação antifúngica licenciados para uso em humanos até o momento. O primeiro anticorpo antifúngico a ser avaliado em um estágio mais avançado foi o MAb 18B7 contra o antígeno polissacarídico glucuronoxilomana (GXM) presente na cápsula polissacarídica de *C. neoformans*, chegando a ser testado em estudos de fase I. Os testes mostraram um certo grau de toxicidade, aumento de carga viral em pacientes HIV positivos com meningite criptocócica, e desenvolvimento de HAMA (do inglês Human Anti-Mouse Antibody) em 10% dos tratados, além da farmacocinética não poder ter sido estabelecida (LARSEN et al., 2005). O fragmento de anticorpo recombinante humano contra a proteína de choque térmico HSP90 de *C. albicans*, Efungumab (nome comercial Mycograb) chegou a ser testado em estudos de fase III (BUGLI et al., 2013). A fórmula original, constituída por variantes cis e trans, mostrou efeito sinérgico quando associado a compostos azólicos e anfotericina B (PACHL et al., 2006), mas também gerou efeitos adversos e tóxicos (BUGLI et al., 2013). Na tentativa de contornar os problemas encontrados, uma variante C28Y foi sintetizada, no entanto testes em camundongos neutropênicos demonstraram que a monoterapia com a variante de Efungumab não foi eficaz e que a sua combinação com anfotericina B desoxicolato não resultou em sinergia (LOUIE et al., 2011).

Visando encontrar alternativas eficazes para o desenvolvimento de novas terapias contra a Paracoccidiodomicose e a Histoplasmose, utilizamos nesse trabalho diferentes técnicas de genética molecular. Em um dos projetos, identificamos a Histona H2B e uma proteína carreadora de ADP/ATP como moléculas enriquecidas nas superfícies de leveduras de *Paracoccidioides* spp.. As sequências codantes foram inseridas em vetores de expressão para futuras análises quanto ao potencial como alvos terapêuticos. Também obtivemos sucesso na síntese de um anticorpo quimérico contra a proteína de choque térmico HSP60. Os resultados foram promissores, mostrando o aumento da fagocitose de células de *P. lutzii* e *H. capsulatum* quando opsonizadas pela quimera, e uma redução na carga fúngica pulmonar e esplênica de camundongos infectados com *H. capsulatum* 7 dias após tratamento. Padronizamos ainda uma metodologia baseada no sistema CRISPR/Cas9 para mutação gênica em

H. capsulatum, essa ferramenta permite o estudo da importância de genes no curso da Histoplasmose. As sequências identificadas como essências podem ser utilizadas para síntese de peptídeos vacinais ou inseridas em vetores para expressão de proteínas alvo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES PARENTE-ROCHA, J. et al. Macrophage Interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Cells Modulates Fungal Metabolism and Generates a Response to Oxidative Stress. 2015.

ALVES PARENTE-ROCHA, J. et al. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2017/9870679>>. Acesso em: 9 jun. 2020.

AMARAL, A. C. et al. Poly(lactic acid-glycolic acid) nanoparticles markedly improve immunological protection provided by peptide P10 against murine paracoccidioidomycosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 5, p. 1126–1132, mar. 2010.

ARRAS, S. D. M. et al. Targeted genome editing via CRISPR in the pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, 1 out. 2016.

BABADY, N. E. et al. Detection of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum* from culture isolates and clinical specimens by use of real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3204–3208, set. 2011.

BABIUK, S. et al. Increased gene expression and inflammatory cell infiltration caused by electroporation are both important for improving the efficacy of DNA vaccines. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 1, p. 1–10, 13 maio 2004.

BARROZO, L. V. et al. Climate and Acute/Subacute Paracoccidioidomycosis in a Hyper-Endemic Area in Brazil. **International Journal of Epidemiology**, v. 38, n. 6,

p. 1642–1649, jan. 2009.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F. et al. Endemic paracoccidioidomycosis: Relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 313–318, abr. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.3109/13693786.2012.714529>>. Acesso em: 31 mar. 2020.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 3, p. 546–550, set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21896820>>. Acesso em: 28 mar. 2020.

BERNETT, M. J. et al. Engineering Fully Human Monoclonal Antibodies from Murine Variable Regions. **Journal of Molecular Biology**, v. 396, n. 5, p. 1474–1490, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.12.046>>.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M. Endemic systemic mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and blastomycosis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 9, n. 9, p. 705–715, 1 set. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1610-0387.2011.07731.x>>. Acesso em: 11 ago. 2020.

BROSCH, G.; LOIDL, P.; GRAESSLE, S. **Histone modifications and chromatin dynamics: A focus on filamentous fungi** *FEMS Microbiology Reviews* Wiley-Blackwell, , maio 2008. .

BUCCHERI, R. et al. Incubation Period and Early Natural History Events of the Acute Form of Paracoccidioidomycosis: Lessons from Patients with a Single Paracoccidioides spp. Exposure. **Mycopathologia**, v. 181, n. 5–6, p. 435–439, 1 jun. 2016.

BUGLI, F. et al. Human Monoclonal Antibody-Based Therapy in the Treatment of Invasive Candidiasis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, 2013.

BUISSA-FILHO, R. et al. The Monoclonal Antibody against the Major Diagnostic Antigen of Paracoccidioides brasiliensis Mediates Immune Protection in Infected

BALB/c Mice Challenged Intratracheally with the Fungus. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 76, n. 7, p. 3321–3328, 2008.

BURNIE, J. P. et al. Fungal Heat-Shock Proteins in Human Disease. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 53–88, jan. 2006.

CABRAL-MARQUES, O. et al. Expanding the clinical and genetic spectrum of human CD40L deficiency: The occurrence of paracoccidioidomycosis and other unusual infections in brazilian patients. **Journal of Clinical Immunology**, v. 32, n. 2, p. 212–220, abr. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22193914/>>. Acesso em: 12 maio. 2021.

CALICH, V. L. G. et al. Innate Immunity to Paracoccidioides Brasiliensis Infection. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 223–236, maio 2008.

CAMBIER, L. et al. Assessment of immunogenicity and protective efficacy of Microsporium canis secreted components coupled to monophosphoryl lipid-A adjuvant in a vaccine study using guinea pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 175, n. 2–4, p. 304–311, 2015.

CANO, M. The epidemiology of histoplasmosis: A review. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 16, n. 2, p. 109–118, 1 jun. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882054601000172>>. Acesso em: 28 mar. 2020.

CASADEVALL, A.; DADACHOVA, E.; PIROFSKI, L. A. **Passive antibody therapy for infectious diseases** **Nature Reviews Microbiology**, set. 2004. .

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Adjunctive Immune Therapy for Fungal Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 7, p. 1048–1056, out. 2001.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. IMMUNOGLOBULINS IN DEFENSE, PATHOGENESIS AND THERAPY OF FUNGAL DISEASES. **Cell host & microbe**, v. 11, n. 5, p. 447–456, maio 2012.

CHARPENTIER, E.; DOUDNA, J. A. Biotechnology: Rewriting a genome. **Nature**, v. 495, n. 7439, p. 50–51, 6 mar. 2013.

CHARPENTIER, E.; MARRAFFINI, L. A. **Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for**

genetic engineering**Current Opinion in Microbiology**Elsevier Ltd, , jun. 2014. .
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25048165>>. Acesso em: 13 maio. 2020.

CHATURVEDI, A. K. et al. Vaccine-Mediated Immune Responses to Experimental Pulmonary *Cryptococcus gattii* Infection in Mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104316, 13 ago. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0104316>>. Acesso em: 17 jun. 2020.

CHAVES, E. G. A. et al. Proteomic Analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* During Infection of Alveolar Macrophages Primed or Not by Interferon-Gamma. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 5 fev. 2019.

CLEARE, L. G.; ZAMITH-MIRANDA, D.; NOSANCHUK, J. D. Heat Shock Proteins in *Histoplasma* and *Paracoccidioides*. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/global/index.html>>. Acesso em: 24 mar. 2020.

COLE, J. et al. The therapeutic potential of epigenetic manipulation during infectious diseases. 2016. Disponível em: <<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

CONG, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 15 fev. 2013.

COSTA, A. N. et al. The lung in paracoccidioidomycosis: new insights into old problems. **Clinics**, v. 68, n. 4, p. 441–448, 2013.

COX, D. B. T.; PLATT, R. J.; ZHANG, F. **Therapeutic genome editing: Prospects and challenges****Nature Medicine**Nature Publishing Group, , 2015. . Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4492683&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 maio. 2020.

CRUM, N. F.; LEDERMAN, E. R.; WALLACE, M. R. **Infections associated with tumor necrosis factor- α antagonists****Medicine**, set. 2005. . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148729>>. Acesso em: 28 mar. 2020.

CUKJATI, D. et al. Real time electroporation control for accurate and safe in vivo non-viral gene therapy. **Bioelectrochemistry**, v. 70, n. 2, p. 501–507, maio 2007.

DANG, V. T. et al. Sci-Hub | A Simple Methodology for Conversion of Mouse Monoclonal Antibody to Human-Mouse Chimeric Form. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 1–6 | 10.1155/2013/716961. **Clinical and Developmental Immunology**, 2013. Disponível em: <<https://sci-hub.tw/10.1155/2013/716961>>. Acesso em: 4 jun. 2020.

DAVIS, A. M.; PIERSON, R. N.; LOYD, J. E. **Mediastinal fibrosis** *Seminars in Respiratory Infections* W.B. Saunders, , jun. 2001. . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11521244>>. Acesso em: 1 abr. 2020.

DE ALMEIDA, J. N.; PEÇANHA, P. M.; COLOMBO, A. L. **Paracoccidioidomycosis in immunocompromised patients: A literature review** *Journal of Fungi* MDPI AG, , 1 mar. 2019. . Disponível em: <[pmc/articles/PMC6463037/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36463037/)>. Acesso em: 12 maio. 2021.

DE ALMEIDA, J. R. F. et al. The Efficacy of Humanized Antibody against the Sporothrix Antigen, gp70, in Promoting Phagocytosis and Reducing Disease Burden. 2017. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 13 maio. 2021.

DE MATTOS GROSSO, D. et al. Characterization of gp70 and Anti-gp70 Monoclonal Antibodies in Paracoccidioides brasiliensis Pathogenesis. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 71, n. 11, p. 6534–6542, 2003.

DE MELO MARQUES, M. A. et al. Bacterial and host-derived cationic proteins bind alpha2-laminins and enhance Mycobacterium leprae attachment to human Schwann cells. **Microbes and infection**, v. 2, n. 12, p. 1407–17, out. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11099926>>. Acesso em: 27 mar. 2020.

DIAS, M. A. G. et al. Isolation of Histoplasma capsulatum from bats in the urban area of São Paulo State, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 10, p. 1642–1644, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S095026881000289X>>. Acesso em: 13 nov. 2010.

DICARLO, J. E. et al. Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-abstract/41/7/4336/1075252>>. Acesso em: 18 maio. 2020.

DOMINGUEZ, A. A.; LIM, W. A.; QI, L. S. **Beyond editing: Repurposing CRISPR-**

Cas9 for precision genome regulation and interrogation*Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Publishing Group, , 1 jan. 2016. .

DOS SANTOS, J. W. A. et al. Chronic cavitary pulmonary histoplasmosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 11, p. 1161–1164, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132009001100016&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 12 maio. 2021.

DOS SANTOS, M. L. et al. **Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development***Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* Faculdade de Ciencias Farmaceuticas (Biblioteca), , 2018. .

DOUDNA, J. A.; GERSBACH, C. A. **Genome editing: The end of the beginning***Genome Biology* BioMed Central Ltd., , 23 dez. 2015. .

DOWDS, C. M. et al. **Lipid antigens in immunity***Biological Chemistry* NIH Public Access, , 1 jan. 2014. . Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4128234/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2482234/)>. Acesso em: 12 maio. 2021.

ELLWANGER, J. H. et al. Beyond diversity loss and climate change: Impacts of Amazon deforestation on infectious diseases and public health. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 92, n. 1, p. 20191375, 2020. Disponível em: <www.scielo.br/aabc%7Cwww.fb.com/aabcjournal>. Acesso em: 11 ago. 2020.

EMBLETON, N.; HARKENSEE, C.; MCKEAN, M. Palivizumab for preterm infants. Is it worth it? **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, v. 90, n. 4, p. F286–F289, jul. 2005.

FAN, Y.; LIN, X. Multiple applications of a transient CRISPR-Cas9 coupled with electroporation (TRACE) system in the cryptococcus neoformans species complex. **Genetics**, v. 208, n. 4, p. 1357–1372, 1 abr. 2018.

FERREIRA, M. S. Paracoccidioidomycosis. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 10, n. 4, p. 161–165, dez. 2009.

FLINGAI, S. et al. **Synthetic DNA vaccines: Improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants***Frontiers in Immunology* Frontiers Media SA, , 2013. .

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 129–132, 1987.

FULLER, K. K. et al. Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 11, p. 1073–1080, 1 nov. 2015.

GERAMI-NEJAD, M. et al. Shuttle vectors for facile gap repair cloning and integration into a neutral locus in *Candida albicans*. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. PART3, p. 565–579, 2013.

GG, K. Human Anti-Mouse Antibodies. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 124, n. 6, 2000.

GREIG, S. L. Obiltoximab: First Global Approval. **Drugs**, v. 76, n. 7, p. 823–830, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27085536>>.

GUIMARÃES, A. J. et al. Biological function and molecular mapping of M antigen in yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. **PloS one**, v. 3, n. 10, p. e3449, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927619>>. Acesso em: 26 out. 2019.

GUIMARÃES, A. J. et al. Monoclonal Antibodies to Heat Shock Protein 60 Alter the Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 4, p. 1357–1367, abr. 2009.

GUIMARÃES, A. J. et al. Agglutination of *Histoplasma capsulatum* by IgG monoclonal antibodies against Hsp60 impacts macrophage effector functions. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 2, p. 918–927, 1 fev. 2011. Disponível em: <<http://iai.asm.org/>>. Acesso em: 21 set. 2020.

HARDING, F. A. et al. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions. **mAbs**, v. 2, n. 3, p. 256–265, maio 2010. Disponível em: <</pmc/articles/PMC2881252/>>. Acesso em: 12 maio. 2021.

HASIN, Y.; SELDIN, M.; LUSIS, A. Multi-omics approaches to disease. 2017.

Disponível em: <<http://ihec-epigenomes.org/>>. Acesso em: 29 maio. 2020.

HASSANI, M.; PATEL, M. C.; PIROFSKI, L. A. **Vaccines for the prevention of diseases caused by potential bioweapons***Clinical Immunology* Academic Press Inc., , abr. 2004. . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15093546>>. Acesso em: 6 abr. 2020.

HASSON, S. S. A. A.; AL-BUSAIDI, J. K. Z.; SALLAM, T. A. **The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations***Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* Hainan Medical University, , 1 maio 2015. .

HEINZ, S. et al. Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. **Molecular Cell**, v. 38, n. 4, p. 576–589, 28 maio 2010.

HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R. et al. Reassessing therapeutic antibodies for neglected and tropical diseases. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007860>>. Acesso em: 1 abr. 2020.

HU, Z. et al. **Antibodies specific for nucleic acids and applications in genomic detection and clinical diagnostics***Expert Review of Molecular Diagnostics* Expert Reviews Ltd., , 2014. . Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14737159.2014.931810>>. Acesso em: 12 maio. 2021.

HUNG, C. Y. et al. An agonist of human complement fragment C5a enhances vaccine immunity against *Coccidioides* infection. **Vaccine**, v. 30, n. 31, p. 4681–4690, 29 jun. 2012.

HWANG, L. et al. Identifying phase-specific genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* using a genomic shotgun microarray. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. 6, p. 2314–2326, 1 jun. 2003.

HWANG, W. Y. K.; FOOTE, J. Immunogenicity of Engineered Antibodies. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 36, n. 1, p. 3–10, maio 2005.

IMANO, E. C. M. **VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Histoplasma capsulatum***. 2005. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2005.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. **Translating the histone code** *Science* American Association for the Advancement of Science, , 10 ago. 2001. .

JERNE, N. K. Towards a network theory of the immune system.

COLLECT. ANN. INST. PASTEUR, v. 125 C, n. 1–2, p. 373–389, 1 jan. 1974.

Disponível em: <<http://europepmc.org/article/med/4142565>>. Acesso em: 12 ago. 2020.

JONES, P. T. et al. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. **Nature**, v. 321, n. 6069, p. 522–525, 1986.

JR, de A. et al. Therapeutic Vaccine Using a Monoclonal Antibody Against a 70-kDa Glycoprotein in Mice Infected With Highly Virulent *Sporothrix Schenckii* and *Sporothrix Brasiliensis*. **Medical mycology**, v. 53, n. 1, 2015.

KASUGA, T. et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*.

Molecular Ecology, v. 12, n. 12, p. 3383–3401, dez. 2003. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-294X.2003.01995.x>>. Acesso em: 30 jan. 2020.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis. In: DISMUKES, W. E.; PAPPAS, P. G.; SOBEL, J. D. (Ed.). **Clinical Mycology**. New York: Oxford University Press, 2003. p. 285–298.

KAUFFMAN, C. A. **Histoplasmosis: A clinical and laboratory update** *Clinical Microbiology Reviews*, jan. 2007. .

KHAN, M. M. et al. **Multi-omics strategies uncover host-pathogen**

interactions *ACS Infectious Diseases* American Chemical Society, , 12 abr. 2019. .

Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.9b00080>>. Acesso em: 29 maio. 2020.

KOZAK, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. **Journal of Molecular Biology**, v. 196, n. 4, p. 947–950, 20 ago. 1987.

KUJOTH, G. C. et al. CRISPR/Cas9-mediated gene disruption reveals the importance of zinc metabolism for fitness of the dimorphic fungal pathogen *Blastomyces dermatitidis*. **mBio**, v. 9, n. 2, 1 mar. 2018.

KUROWSKI, R.; OSTAPCHUK, M. Overview of histoplasmosis. **American Family Physician**, v. 66, n. 12, p. 2247- 2252+2255, 2002.

KUSCU, C. et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 677–683, 18 maio 2014.

KUTZLER, M. A. et al. Coimmunization with an Optimized IL-15 Plasmid Results in Enhanced Function and Longevity of CD8 T Cells That Are Partially Independent of CD4 T Cell Help. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 1, p. 112–123, 1 jul. 2005.

LARSEN, R. A. et al. Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murine-derived anticryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 952–958, mar. 2005.

LEITÃO, N. P. et al. Paracoccidioides Lutzii Plp43 Is an Active Glucanase with Partial Antigenic Identity with P. Brasiliensis Gp43. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, p. e3111, ago. 2014.

LIEBER, M. R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, n. 1, p. 181–211, 7 jun. 2010.

LINDER, K. A.; KAUFFMAN, C. A. **Histoplasmosis: Epidemiology, Diagnosis, and Clinical Manifestations** **Current Fungal Infection Reports** Current Medicine Group LLC 1, , 15 set. 2019. . Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12281-019-00341-x>>. Acesso em: 1 abr. 2020.

LIONAKIS, M. S.; ILIEV, I. D.; HOHL, T. M. **Immunity against fungi** **JCI insight** NLM (Medline), , 2 jun. 2017. . Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5453709/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35453709/)>. Acesso em: 12 maio. 2021.

LIU, R. et al. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. **Cell Discovery**, v. 1, n. 1, p. 1–11, 12 maio 2015.

LONG, K. H. et al. Identification of Heat Shock Protein 60 as the Ligand on *Histoplasma Capsulatum* That Mediates Binding to CD18 Receptors on Human

Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 487–494, jan. 2003.

LOUIE, A. et al. Dose range evaluation of mycograb C28Y variant, a human recombinant antibody fragment to heat shock protein 90, in combination with amphotericin B-desoxycholate for treatment of murine systemic candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3295–3304, jul. 2011.

LU, R. M. et al. **Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases** **Journal of Biomedical Science** BioMed Central Ltd., , 2 jan. 2020. .

LUGER, K. **Structure and dynamic behavior of nucleosomes** **Current Opinion in Genetics and Development** Elsevier Ltd, , 1 abr. 2003. .

LUO, P. et al. A self-augmenting gene expression cassette for enhanced and sustained transgene expression in the presence of proinflammatory cytokines. **DNA and Cell Biology**, v. 25, n. 12, p. 659–667, dez. 2006.

MARQUES, M. A. M. et al. Further biochemical characterization of Mycobacterium leprae laminin-binding proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 4, p. 463–470, 2001.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 610–615, nov. 2012.

MARTINEZ, R. EPIDEMIOLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 11–20, set. 2015.

MARTINEZ, R. **New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology** **Journal of Fungi** MDPI AG, , 1 mar. 2017. .

MATSU-URA, T. et al. Efficient gene editing in Neurospora crassa with CRISPR technology. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 4, 15 dez. 2015.

Disponível em:

<<https://fungalbiolbiotech.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40694-015-0015-1>>.

Acesso em: 18 maio. 2020.

MIN, K. et al. Candida albicans Gene Deletion with a Transient CRISPR-Cas9 System. **mSphere**, v. 1, n. 3, 22 jun. 2016.

MORAES-VASCONCELOS, D. de et al. Paracoccidioides Brasiliensis Disseminated Disease in a Patient with Inherited Deficiency in the B1 Subunit of the Interleukin (IL)-12/IL-23 Receptor. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 4, p. 31–37, ago. 2005.

NAMI, S. et al. **Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases** **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson SAS, , 1 fev. 2019. .

NANJAPPA, S. G.; KLEIN, B. S. **Vaccine immunity against fungal infections** **Current Opinion in Immunology** NIH Public Access, , jun. 2014. .

NASCIMENTO, R. C. et al. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of Sporothrix schenckii induces protection in murine sporotrichosis. **European journal of immunology**, v. 38, n. 11, p. 3080–9, nov. 2008.

NAVEED, A. et al. Recapitulation of the anti-Idiotypic antibodies as vaccine candidate. **Translational Medicine Communications**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s41231-018-0021-4>>. Acesso em: 12 maio. 2021.

NEMECEK, J. C.; WÜTHRICH, M.; KLEIN, B. S. Global Control of Dimorphism and Virulence in Fungi. **Science**, v. 312, n. 5773, p. 583–588, abr. 2006.

NG, H.; DEAN, N. Dramatic Improvement of CRISPR/Cas9 Editing in Candida albicans by Increased Single Guide RNA Expression. **mSphere**, v. 2, n. 2, 26 abr. 2017.

NICOLA, A. M. et al. The stress responsive and morphologically regulated hsp90 gene from Paracoccidioides brasiliensis is essential to cell viability. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 158, set. 2008.

NICOLA, A. M.; ANDRADE, R. V.; SILVA-PEREIRA, I. Molecular Chaperones in the Paracoccidioides Brasiliensis Transcriptome. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 4, n. 2, p. 346–357, 2005.

NISHAT, S.; ANDREANA, P. R. **Entirely carbohydrate-based vaccines: An**

emerging field for specific and selective immune responses *Vaccines* MDPI AG, , 1 jun. 2016. . Disponível em: <www.mdpi.com/journal/vaccines>. Acesso em: 12 maio. 2021.

NISONOFF, A.; LAMOYI, E. Implications of the presence of an internal image of the antigen in anti-idiotypic antibodies: Possible application to vaccine production. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 21, n. 3, p. 397–406, 1 dez. 1981.

NØDVIG, C. S. et al. A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0133085, 15 jul. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0133085>>. Acesso em: 18 maio. 2020.

NOSANCHUK, J. D. et al. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 8, p. 1164–1175, 2003.

NOSANCHUK, J. D. et al. Antibody therapy for histoplasmosis. 2012. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 17 dez. 2019.

NOSANCHUK, J. D.; GACSER, A. *Histoplasma capsulatum* at the host-pathogen interface. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 9, p. 973–977, jul. 2008.

OLINS, D. E.; OLINS, A. L. **Chromatin history: Our view from the bridge** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* European Association for Cardio-Thoracic Surgery, , 1 out. 2003. .

OLIVEIRA, A. F.; COELHO, P. S. R. Yeast expressing Gp43 protein as a vaccine against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2017. 1625p. 213–224.

PACHL, J. et al. A Randomized, Blinded, Multicenter Trial of Lipid-Associated Amphotericin B Alone versus in Combination with an Antibody-Based Inhibitor of Heat Shock Protein 90 in Patients with Invasive Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 10, p. 1404–1413, 15 maio 2006.

PALMIERI, F.; MONNÉ, M. Discoveries, metabolic roles and diseases of mitochondrial carriers: A review. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 10, p. 2362–2378, 1 out. 2016.

PAN, S. Y. et al. **Immunomodulatory potential of anti-idiotypic antibodies for the treatment of autoimmune diseases***Future Science OA*Future Medicine Ltd., , 1 fev. 2021. . Disponível em: <<https://www.future-science.com/doi/abs/10.2144/fsoa-2020-0142>>. Acesso em: 12 maio. 2021.

PANIAGO, A. M. M. et al. Paracoccidioidomycosis in patients with human immunodeficiency virus: Review of 12 cases observed in an endemic region in Brazil. **Journal of Infection**, v. 51, n. 3, p. 248–252, out. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445305000204>>. Acesso em: 11 ago. 2020.

PARRAY, H. A. et al. **Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives***International Immunopharmacology*Elsevier B.V., , 1 ago. 2020. . Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7255167/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3255167/)>. Acesso em: 12 maio. 2021.

PATHAKUMARI, B.; LIANG, G.; LIU, W. **Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review***Biomedicine and Pharmacotherapy*Elsevier Masson SAS, , 1 out. 2020. .

PETHE, K. et al. Mycobacterium smegmatis laminin-binding glycoprotein shares epitopes with Mycobacterium tuberculosis heparin-binding haemagglutinin. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 89–99, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123691>>. Acesso em: 27 mar. 2020.

PIETRELLA, D. et al. A β -glucan-conjugate vaccine and anti- β -glucan antibodies are effective against murine vaginal candidiasis as assessed by a novel in vivo imaging technique. **Vaccine**, v. 28, n. 7, p. 1717–1725, 17 fev. 2010.

PINTO, A. R. et al. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from Paracoccidioides brasiliensis. **Vaccine**, v. 18, n. 26, p. 3050–3058, 1 jul. 2000.

PONTES, A. M. et al. A rare paracoccidioidomycosis diagnosis in a kidney transplant receptor: Case report. In: Transplantation Proceedings, 4, **Anais...**Elsevier USA, 1 maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26036516>>.

Acesso em: 28 mar. 2020.

PORTA, A.; MARESCA, B. Host response and *Histoplasma capsulatum* / macrophage molecular interactions . **Medical Mycology**, v. 38, n. 6, p. 399–406, jan. 2000.

POUNDER, J. I.; HANSEN, D.; WOODS, G. L. Identification of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Coccidioides* species by repetitive-sequence-based PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2977–2982, ago. 2006.

PUCCIA, R. et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 1, p. 199–206, 1986. Disponível em: </pmc/articles/PMC260097/?report=abstract>. Acesso em: 13 ago. 2020.

QUAGLIATO, R. et al. Associação entre paracoccidioidomicose e tuberculose: Realidade e erro diagnóstico. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 3, p. 295–300, maio 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17906791>>. Acesso em: 28 mar. 2020.

RAPPLEYE, C. A.; EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E. *Histoplasma capsulatum* α -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 4, p. 1366–1370, 23 jan. 2007.

RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining Virulence Genes in the Dimorphic Fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 281–303, out. 2006.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis* : how far from solving the riddle? . **Medical Mycology**, v. 39, n. 3, p. 233–241, jan. 2001.

RICHIE, D. L. et al. Nonspecific Effect of Mycograb on Amphotericin B MIC. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 3963–3964, jul. 2012.

RODRIGUES, G. da S. et al. Association between paracoccidioidomycosis and cancer. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 3, p. 356–362, jun. 2010.

ROMÁN, E. et al. **New insights of CRISPR technology in human pathogenic fungi***Future Microbiology*Future Medicine Ltd., , set. 2019. . Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2019-0183>>. Acesso em: 9 jun. 2020.

ROMANI, L. **Immunity to fungal infections***Nature Reviews Immunology*European Association for Cardio-Thoracic Surgery, , 2004. . Disponível em: <www.nature.com/reviews/immunol>. Acesso em: 12 maio. 2021.

RUPRECHT, J. J. et al. Structures of yeast mitochondrial ADP/ATP carriers support a domain-based alternating-access transport mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 4, p. E426–E434, 28 jan. 2014.

SALES, N. S. et al. In vivo electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8⁺ T cells. **Vaccine**, v. 35, n. 52, p. 7240–7249, 19 dez. 2017.

SAMUELSON, D. R. et al. Oral Immunization of Mice with Live *Pneumocystis murina* Protects against *Pneumocystis Pneumonia* . **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 6, p. 2655–2665, 15 mar. 2016.

SAN FILIPPO, J.; SUNG, P.; KLEIN, H. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 229–257, jun. 2008.

SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. **CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes***Nature Biotechnology*Nature Publishing Group, , 2014. .

SANTOS, W. A. dos et al. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 245–253, fev. 2003.

SCHWANHÜSSER, B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 337–342, 19 maio 2011.

SCORZONI, L. et al. **Antifungal therapy: New advances in the understanding and treatment of mycosis***Frontiers in Microbiology*Frontiers Media S.A., , 23 jan.

2017. .

SEPÚLVEDA, V. E. et al. Genome sequences reveal cryptic speciation in the human pathogen *Histoplasma capsulatum*. **mBio**, v. 8, n. 6, 1 nov. 2017.

SEPÚLVEDA, V. E.; WILLIAMS, C. L.; GOLDMAN, W. E. Comparison of phylogenetically distinct *Histoplasma* strains reveals evolutionarily divergent virulence strategies. **mBio**, v. 5, n. 4, 1 jul. 2014.

SHAHBAZIAN, M. D.; GRUNSTEIN, M. Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, n. 1, p. 75–100, 7 jun. 2007.

SHALEM, O.; SANJANA, N. E.; ZHANG, F. **High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9** *Nature Reviews Genetics* Nature Publishing Group, , 21 maio 2015. .

SHAPIRO, R. S.; COWEN, L. E. Coupling Temperature Sensing and Development: Hsp90 Regulates Morphogenetic Signalling in *Candida Albicans*. **Virulence**, v. 1, n. 1, p. 45–48, jan. 2010.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, jun. 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. **Neoplasia and paracoccidioidomycosis** *Mycopathologia*, abr. 2008. . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18780466>>. Acesso em: 28 mar. 2020.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. **Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2017. .

SILVA-VERGARA, M. L. et al. Paracoccidioidomycosis associated with human immunodeficiency virus infection: Report of 10 cases. **Medical Mycology**, v. 41, n. 3, p. 259–263, jun. 2003.

SOUZA, A. C. O.; TABORDA, C. P. Epidemiology of Dimorphic Fungi. In: **Reference Module in Life Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2020.

STANOVA, A. K. et al. Anti-Idiotypic Agonistic Antibodies: Candidates for the Role of Universal Remedy. **Antibodies**, v. 9, n. 2, p. 19, 28 maio 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7345059/?report=abstract>. Acesso em: 12 ago. 2020.

STEINFELD, I.; SHAMIR, R.; KUPIEC, M. A genome-wide analysis in *Saccharomyces cerevisiae* demonstrates the influence of chromatin modifiers on transcription. **Nature Genetics**, v. 39, n. 3, p. 303–309, 26 mar. 2007.

STEVENS, D. A.; CLEMONS, K. V.; LIU, M. Developing a vaccine against aspergillosis. **Medical Mycology**, v. 49, n. S1, p. S170–S176, 1 abr. 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.3109/13693786.2010.497775>. Acesso em: 17 jun. 2020.

SUBRAMANIAN, I. et al. **Multi-omics Data Integration, Interpretation, and Its Application** *Bioinformatics and Biology Insights* SAGE Publications Inc., , 2020. .

TABORDA, C. P. et al. PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS: CHALLENGES IN THE DEVELOPMENT OF A VACCINE AGAINST AN ENDEMIC MYCOSIS IN THE AMERICAS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. suppl 19, p. 21–24, set. 2015.

TEIXEIRA, M. M. et al. Paracoccidioides Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, 2014.

THOMAZ, L. **Proteção ou exacerbação de anticorpos monoclonais gerados contra antígenos de Paracoccidioides brasiliensis na infecção experimental**. 2012. Universidade de São Paulo, 2012.

THOMAZ, L. et al. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 induce a protective immune response against experimental *Paracoccidioides lutzii*. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 9, p. 788–795, set. 2014.

TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. New advances in the development of a vaccine against paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 1771–7, jul. 2012.

TRIBUS, M. et al. A novel motif in fungal class 1 histone deacetylases is essential for growth and development of *Aspergillus*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, n. 2,

p. 345–353, 15 jan. 2010.

TROLLET, C. et al. Electrotransfer into Skeletal Muscle for Protein Expression. **Current Gene Therapy**, v. 6, n. 5, p. 561–578, 27 set. 2006.

TSAI, C. W.; MORRIS, S. Approval of Raxibacumab for the treatment of inhalation anthrax under the US food and drug administration “Animal Rule”. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. DEC, p. 1–5, 2015.

TSAI, S. Q.; JOUNG, J. K. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 5, p. 300–312, 1 maio 2016.

TSURUSHITA, N.; HINTON, P. R.; KUMAR, S. Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax. **Methods**, v. 36, n. 1, p. 69–83, maio 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202305000174>>. Acesso em: 4 jun. 2020.

TURNER, B. M. Defining an epigenetic code. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 2–6, jan. 2007.

UNIS, G.; ROESCH, E. W.; SEVERO, L. C. Histoplasmose pulmonar aguda no Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 52–59, fev. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132005000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 12 maio. 2021.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; LOEHR, B. I.; BABIUK, L. A. Immunization of livestock with DNA vaccines: Current studies and future prospects. In: Vaccine, 17–19, **Anais...Vaccine**, 21 mar. 2001.

VANNIASINKAM, T.; REDDY, S. T.; ERTL, H. C. J. DNA immunization using a non-viral promoter. **Virology**, v. 344, n. 2, p. 412–420, 20 jan. 2006.

VAQUERO, A.; LOYOLA, A.; REINBERG, D. **The constantly changing face of chromatin. Science of aging knowledge environment : SAGE KESci Aging Knowledge Environ**, , 2003. .

VYAS, V. K. et al. New CRISPR Mutagenesis Strategies Reveal Variation in Repair Mechanisms among Fungi. **mSphere**, v. 3, n. 2, 25 abr. 2018.

VYAS, V. K.; BARRASA, M. I.; FINK, G. R. A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. **Science Advances**, v. 1, n. 3, 1 abr. 2015.

WANG, H. et al. The C-type lectin receptor MCL mediates vaccine-induced immunity against infection with *Blastomyces dermatitidis*. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 3, p. 635–642, 1 mar. 2016a.

WANG, H.; LA RUSSA, M.; QI, L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 227–264, 2 jun. 2016.

WANG, Q.; COLEMAN, J. J. **Progress and Challenges: Development and Implementation of CRISPR/Cas9 Technology in Filamentous Fungi** *Computational and Structural Biotechnology Journal* Elsevier B.V., , 1 jan. 2019. .

WANG, Y. et al. A “suicide” CRISPR-Cas9 system to promote gene deletion and restoration by electroporation in *Cryptococcus neoformans*. **Scientific Reports**, v. 6, 8 set. 2016b.

WHEAT, J. et al. Practice Guidelines for the Management of Patients with Histoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 688–695, 1 abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10770731>>. Acesso em: 1 abr. 2020.

WHEAT, L. J. et al. **Pulmonary Histoplasmosis Syndromes: Recognition, Diagnosis, and Management** *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, abr. 2004. . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16088457>>. Acesso em: 1 abr. 2020.

WHEAT, L. J. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Patients with Histoplasmosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 7, p. 807–825, out. 2007.

WONG, L. P. et al. DNA immunization using a secreted cell wall antigen Mp1p is protective against *Penicillium marneffei* infection. **Vaccine**, v. 20, n. 23–24, p. 2878–2886, 26 jul. 2002.

WOOD, K. L. et al. Histoplasmosis after treatment with anti-tumor necrosis factor- α therapy. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, n. 9, p. 1279–1282, 1 maio 2003. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200206-563OC>>. Acesso em: 28 mar. 2020.

WÜTHRICH, M. et al. Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 2, p. 554–568, 1 fev. 2011.

YAN, J. et al. Immunogenicity of a novel engineered HIV-1 clade C synthetic consensus-based envelope DNA vaccine. **Vaccine**, v. 29, n. 41, p. 7173–7181, 22 set. 2011.

YARZABAL, L. A. et al. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. **Sabouraudia**, v. 15, n. 1, p. 79–85, 1 mar. 1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/404719>>. Acesso em: 13 ago. 2020.

ZERBE, C. S.; HOLLAND, S. M. Disseminated Histoplasmosis in Persons with Interferon- Receptor 1 Deficiency. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 4, p. 38–41, 15 ago. 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/432120>>. Acesso em: 28 mar. 2020.

ZHANG, C. et al. Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 86, p. 47–57, 1 jan. 2016.

ANEXO I

Seleção de proteínas identificadas em bandas extraídas após eletroforese de extratos do isolado Pb01 (10-40 kDa)

Fasta headers	[kDa]	iBAQ	Fasta headers	[kDa]	iBAQ
Nucleoside diphosphate kinase	16,774	1,7E+08	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	36,394	591770
Histone H2B	15,081	1,17E+08	3-ketoacyl-CoA thiolase	43,441	590000
Histone H3.3	15,361	73924000	Histone chaperone	32,932	583290
Uncharacterized protein	11,629	73217000	Dienelactone hydrolase family protein	26,571	532000
ADP,ATP carrier protein	33,598	65784000	Cytochrome c oxidase polypeptide V	22,538	531760
Mitochondrial outer membrane protein porin	22,93	65150000	Superoxide dismutase	17,5	528820
40S ribosomal protein S2	28,372	56940000	40S ribosomal protein S25	11,778	526660
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	15,307	48937000	Fructose-bisphosphate aldolase 1	39,631	524760
Histone H2A	20,506	38263000	40S ribosomal protein S21	9,859	524680
40S ribosomal protein S26	13,744	37816000	GTP:AMP phosphotransferase, mitochondrial	28,378	523660
Malate dehydrogenase	35,987	29579000	50S ribosomal protein Mrp49	23,099	522600
60S ribosomal protein L13	24,484	25064000	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A	31,42	520640
60S ribosomal protein L7-C	29,959	22785000	Uncharacterized protein	21,851	520330
Cytochrome b-c1 complex subunit 7	14,48	20967000	LiPid Depleted family member	34,459	510620
Uncharacterized protein	13,715	20651000	Serine/threonine-protein phosphatase	37,42	502750
Hsp90 binding co-chaperone (Sba1)	22,899	20316000	Adenylate kinase	30,413	478430
60S ribosomal protein L31	19,958	19701000	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, Delta(2)-enoyl-CoA isomerase	30,15	473420
NADH dehydrogenase iron-sulfur protein	32,859	19386000	S1-like domain-containing protein	15,189	467780
60S ribosomal protein L27	16,599	18682000	ATP-dependent RNA helicase eIF4A	44,765	462220
Histone H2A	14,311	17682000	50S ribosomal protein L11	16,273	462140
40S ribosomal protein S6	27,178	15316000	NADH-ubiquinone oxidoreductase	18,109	461770
40S ribosomal protein S13-1	16,835	15132000	Vesicle-associated membrane protein	27,359	461170
Uncharacterized protein	18,262	12934000	Vacuolar transporter chaperone 1	14,038	458560
Cyanate hydratase	18,086	12890000	Uncharacterized protein	19,207	456780
60S ribosomal protein L2	27,496	11865000	Elongation factor 1-beta	25,95	451400
40S ribosomal protein S16	15,864	11243000	Small COPII coat GTPase sar1	21,467	447400
Peroxioredoxin	29,327	10957000	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	41,577	447230
40S ribosomal protein S1	28,972	10283000	Vacuolar protein-sorting-associated protein	23,758	428860
40S ribosomal protein S14	16,054	10052000	L-threonine 3-dehydrogenase	37,542	423380
Sorbitol utilization protein SOU2	31,388	9927500	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	22,453	421520
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	11,14	9430000	Phosphotyrosine protein phosphatase	21,515	419820
40S ribosomal protein S18	17,966	9292000	Acetyl-CoA acetyltransferase	41,192	418190
Protein YOP1	23,765	8900500	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	29,997	417180
Vacuolar ATP synthase subunit E	26,665	8703900	Dihydrodipicolinate synthase	33,159	416090
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3	11,093	7921300	60S ribosomal protein L22	13,993	414900
Ribosomal protein L35	14,772	7446200	Triosephosphate isomerase	27,061	400210
Electron transfer flavoprotein subunit beta	28,456	7304900	Alcohol dehydrogenase	37,512	387820
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	32,114	6832700	Fip1 domain-containing protein	38,756	378760

F-actin-capping protein subunit beta	30,079	6704700	Peptide methionine sulfoxide reductase msrA	22,005	372990
Phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein	18,979	6007500	DUF1767 domain-containing protein	27,953	370410
Proteasome subunit alpha type	29,22	5605800	Uncharacterized protein	40,924	364930
Deoxyuridine 5-triphosphate nucleotidohydrolase	22,663	5392300	4HBT domain-containing protein	20,834	364660
40S ribosomal protein S3	29,613	5275100	Suaprga1	35,085	355870
40S ribosomal protein S19	16,42	5194400	Prohibitin-2	34,1	355120
U2 small nuclear ribonucleoprotein B	27,473	5123300	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	27,021	352160
40S ribosomal protein S4	29,303	5091900	mRNA binding post-transcriptional regulator (Csx1)	42,651	350780
Mitochondrial peroxiredoxin PRX1	24,84	4783000	Uncharacterized protein	16,776	349260
Glutathione peroxidase	22,375	4441000	Uncharacterized protein	13,443	339600
ATP synthase subunit gamma	32,523	4430600	26S proteasome regulatory subunit rpn11	35,985	324480
Cytochrome b5 heme-binding domain-containing protein	14,697	4191200	Uncharacterized protein	28,505	318360
Malate dehydrogenase	34,521	4175300	Autophagy-related protein 27	34,265	314150
Serine 3-dehydrogenase	29,102	4115900	Thioesterase family protein	16,993	312720
60S acidic ribosomal protein P0	33,788	3992600	Pyr_redox_2 domain-containing protein	42,749	292310
Mitochondrial import receptor subunit tom-20	22,221	3981000	Thioredoxin reductase	37,983	278530
Ubiquitin-conjugating enzyme variant MMS2	14,945	3721900	Uncharacterized protein	25,592	277110
60S ribosomal protein L4-A	40,135	3566500	26S protease regulatory subunit 8	44,151	274820
Superoxide dismutase	34,048	3344800	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	31,51	274030
Ribonucloprotein	24,82	3115500	Hepatocellular carcinoma down-regulated mitochondrial carrier protein	31,81	267250
DNA damage checkpoint protein rad24	29,642	2935400	Uncharacterized protein	22,44	256150
LYR family protein	15,756	2801500	Peptidylprolyl isomerase	15,314	255610
40S ribosomal protein S9	19,742	2776600	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	38,292	254780
60S ribosomal protein L8-B	33,685	2687000	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein	31,408	254540
Urease accessory protein ureG	28,907	2683900	S-formylglutathione hydrolase	31,427	253230
40S ribosomal protein S24	15,469	2631200	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	43,424	252940
40S ribosomal protein S0	31,925	2590300	60S ribosomal protein L34-B	13,6	250410
Peroxiredoxin	17,981	2590300	Translin associated factor X	28,936	229170
Ribosomal protein L23e	12,299	2510400	Mitochondrial phosphate carrier protein	33,742	227760
Proteasome subunit alpha type	29,765	2307700	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	34,606	227430
Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	30,78	2282600	GrpE protein homolog	28,472	222180
Uncharacterized protein	15,584	2232700	Uncharacterized protein	42,089	220240
ADF-H domain-containing protein	22,208	2168800	Homoisocitrate dehydrogenase	38,633	214190
60S ribosomal protein L26	18,046	2168400	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	19,442	213400
Chorismate mutase	30,927	2164400	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein	32,998	211920
40S ribosomal protein S15	17,599	2139100	Ubiquitin	17,638	210760
Dienelactone hydrolase family protein	27,995	2122900	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial	34,671	209710
Hsp90 co-chaperone AHA1	35,899	2041900	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	36,694	203850
L-PSP endoribonuclease family protein (Hmf1)	13,374	1986200	Phosphoglycerate kinase	45,11	202960

Uncharacterized protein	19,119	1975100	NADH-ubiquinone oxidoreductase 213 kDa subunit	21,515	202800
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	27,528	1969100	Ubiquitin-conjugating enzyme	17,594	202600
Uncharacterized protein	16,294	1965700	Phosphomannomutase	30,253	201800
Sorting nexin-3	16,723	1939000	Uncharacterized protein	30,745	192850
HMG box domain-containing protein	36,25	1935600	Vesicle transport v-SNARE protein vti1	25,86	189910
HIT domain-containing protein	15,072	1927900	Ribosomal_L28e domain-containing protein	16,645	189490
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase	30,693	1919800	Glycine cleavage system H protein	20,459	188910
Uncharacterized protein	35,118	1816700	Deoxyribose-phosphate aldolase	29,594	183910
NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV	23,599	1814800	Pribosyltran domain-containing protein	23,017	180860
Hydroxyacylglutathione hydrolase	28,723	1806500	Proteasome endopeptidase complex	28,936	180850
Mitochondrial carrier protein	33,367	1739000	Actin cytoskeleton protein (VIP1)	28,883	176950
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	19,863	1669200	Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1	31,726	175990
F-actin-capping protein subunit alpha	29,865	1666100	Hydrolase	32,49	174140
60S ribosomal protein L21-A	18,252	1639900	Carbonic anhydrase	20,431	171850
Mitochondrial fission 1 protein	18,549	1592000	Ubiquitin-conjugating enzyme	17,342	170080
40S ribosomal protein S17	16,292	1579400	Methyltransf_25 domain-containing protein	31,88	168440
60S ribosomal protein L18	21,124	1563100	Actin	43,676	166680
BZIP domain-containing protein	35,789	1514400	Nucleic acid-binding protein	31,141	164490
Uncharacterized protein	30,85	1474700	OPA3 domain-containing protein	34,282	159970
40S ribosomal protein S8	22,935	1469400	Uncharacterized protein	28,771	157270
ADF-H domain-containing protein	11,842	1462500	Endosomal cargo receptor (Erp5)	25,497	156580
Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase ubiE (Fragment)	31,017	1449400	Uncharacterized protein	14,717	156510
Uncharacterized protein	22,068	1432800	54S ribosomal protein L23	19,979	154050
Histone H4	16,872	1419800	Mitochondrial ribosomal protein subunit L51	16,909	148400
Ribosomal protein L14	16,655	1416600	Uncharacterized protein	30,403	146900
Uncharacterized protein	28,13	1386900	ATP synthase subunit d, mitochondrial	19,665	145920
AB hydrolase-1 domain-containing protein	34,977	1385800	54S ribosomal protein YmL6	34,029	145660
Proteasome subunit alpha type	27,896	1375500	Uncharacterized protein	18,12	143600
Signal sequence receptor alpha chain	29,715	1353300	Ketol-acid reductoisomerase	15,432	139370
Profilin	14,251	1302900	60S ribosomal protein L9-B	21,736	139140
Reduced viability upon starvation protein	30,129	1287100	TCTP family protein	20,183	138740
KRE9 domain-containing protein	27	1256200	EngB-type G domain-containing protein	33,425	138240
Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	33,438	1244100	2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	27,705	136610
50S ribosomal protein L1	32,626	1240900	4-nitrophenylphosphatase	33,572	134240
40S ribosomal protein S5	23,937	1209700	3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase	29,407	132190
ATP synthase subunit 4	26,002	1205400	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	22,829	119320
60S ribosomal protein L5	63,45	1196300	Trafficking protein particle complex subunit	28,166	117780
6-phosphogluconolactonase	29,149	1176500	Sporulation-regulated protein	44,688	112700
Translation initiation factor SUI1	30,007	1174500	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein	23,421	110080
Polymerase II polypeptide D	17,502	1173900	Short chain dehydrogenase/reductase family	30,176	109950
Mitochondrial methylglutaconyl-CoA hydratase	32,784	1121100	Mitochondrial nuclease	36,939	109270

RRM domain-containing protein	16,488	1100000	Alcohol dehydrogenase	44,351	108680
RRM domain-containing protein	25,754	1087600	Farnesyl pyrophosphate synthetase	39,555	106170
V-SNARE coiled-coil homology domain-containing protein	12,553	1041200	Peroxisomal adenine nucleotide transporter 1	37,025	105360
40S ribosomal protein S10-A	25,478	1020600	Cysteine synthase	40,49	104810
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	27,107	1001800	Mannose-1-phosphate guanyltransferase	41,824	104620
60S ribosomal protein L32	17,931	985630	Transaldolase	35,606	104420
Uncharacterized protein	30,666	981130	Uncharacterized protein	15,527	101250
G-protein complex beta subunit CpcB	35,104	974790	Protein disulfide-isomerase domain	41,262	98339
ATPase GET3	37,431	968590	GTP-binding protein ypt3	23,594	97873
Oxidoreductase 2-nitropropane dioxygenase family	38,861	964180	30S ribosomal protein S17P	18,479	91294
ATP synthase subunit g	21,401	958370	Cell division control protein	44,495	88330
60S ribosomal protein L23a	17,548	950670	Nuclear transcription factor Y subunit C-9	31,007	87099
Maleylacetoacetate isomerase	26,929	929210	GMP synthase	27,812	86620
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	31,969	928630	Mitotic spindle checkpoint component mad2	25,838	85495
60S ribosomal protein L16	23,111	909760	UBX domain-containing protein	42,573	83733
Proliferating cell nuclear antigen	35,9	899180	NAD(P)H-hydrate epimerase	29,527	83342
Cytosolic large ribosomal subunit protein L30	11,604	882750	Cystathionine beta-lyase	48,527	82446
Prohibitin-1	30,921	859780	Mannose-1-phosphate guanyltransferase subunit beta-A	48,354	82237
3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	34,273	849370	Uncharacterized protein	29,216	81010
Ribosomal protein 11 large subunit	20,329	830580	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	36,93	80310
Uncharacterized protein	26,927	804930	Poly(A)+ RNA export protein	39,514	80131
Uncharacterized protein	40,444	790930	Replication factor C subunit 3	44,12	75076
Iron-binding protein erpA	35,267	762720	Pyridoxine biosynthesis protein PDX1	34,085	73521
Uncharacterized protein	24,468	745080	Mitochondrial ribosomal protein S12	22,37	73197
ATP synthase subunit 5	24,594	735120	Uncharacterized protein	46,606	71952
HTH APSES-type domain-containing protein	25,953	733210	60S ribosomal protein L16	25,332	70067
DUF757 domain-containing protein	18,503	731540	Rho GDP-dissociation inhibitor	22,348	68390
Clathrin light chain	26,901	722330	Uncharacterized protein	32,43	67209
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36,47	700210	KRR1 small subunit processome component	41,208	66150
Uncharacterized protein	26,381	697700	Transport protein SEC13	40,44	65040
Uncharacterized protein	26,563	691170	26S proteasome regulatory subunit rpn-8	40,102	63459
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	37,45	671420	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	32,126	61941
Calmodulin	13,047	649040	Mitochondrial DNA replication protein YHM2	33,957	61616
BTB domain-containing protein	31,991	645510	Obg-like ATPase 1	43,794	61449
GTP-binding nuclear protein	23,926	638050	Uncharacterized protein	31,151	51246
Ribose 5-phosphate isomerase A	28,741	637450	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	42,178	49944
60S ribosomal protein L20	21,078	630990	Oxidoreductase	26,74	48104
Adenine phosphoribosyltransferase	22,929	630300	Ubiquitin-conjugating enzyme	28,373	46872
Cell cycle control protein cwf14	17,18	617190	GTP-binding protein ypt5	23,726	37780
40S ribosomal protein S7	28,262	33489	Enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	30,309	32397

Seleção de proteínas identificadas em bandas extraídas após eletroforese de extratos do isolado Pb18 (10-40 kDa)

Fasta headers	[kDa]	iBAQ	Fasta headers	[kDa]	iBAQ
60S ribosomal protein L7	28,554	1735310000	Peroxiredoxin	17,936	8160560
Nucleoside diphosphate kinase	16,804	1137610000	14 3 3 domain-containing protein	27,181	12653900
Uncharacterized protein	31,838	1777157000	Uncharacterized protein	31,349	9173230
ADP,ATP carrier protein	33,617	852502000	Uncharacterized protein	21,763	9876210
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	16,364	313110000	ATP synthase subunit gamma	32,523	10518300
Aha1_N domain-containing protein	36,027	531318000	GrpE protein homolog	28,53	11037890
Histone H2B	15,067	244166000	Uncharacterized protein	27,389	7822650
40S ribosomal protein S26	13,684	138431000	Uncharacterized protein	20,136	4719280
Histone H3	15,389	93552000	40S ribosomal protein S27	15,651	4576480
Uncharacterized protein	17,102	139338000	Small COPII coat GTPase sar1	21,241	8473730
60S ribosomal protein L12	20,771	156750000	Cytochrome c oxidase subunit 4, mitochondrial	23,834	8878480
60S ribosomal protein L27a	16,752	135389000	RPOL4c domain-containing protein	17,502	6087000
Cytochrome b-c1 complex subunit 7	14,488	67670000	Uncharacterized protein	25,268	2333610
Malate dehydrogenase, NAD-dependent	37,978	278870000	Uncharacterized protein	25,016	5671440
Uncharacterized protein	18,323	99816000	60S ribosomal protein L16	23,111	8222570
Uncharacterized protein	13,932	111522000	Aldo_ket_red domain-containing protein	31,485	10038860
40S ribosomal protein S12	17,143	84145000	SGL domain-containing protein	43,075	8857320
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3	10,986	61430000	Abhydrolase_2 domain-containing protein	28,723	7248020
60S ribosomal protein L35	14,759	69781800	Uncharacterized protein	34,748	8326280
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	22,511	78547500	Epimerase domain-containing protein	30,963	5843170
Thioredoxin domain-containing protein	24,889	120835900	Uncharacterized protein	33,622	8078500
CS domain-containing protein	23,444	79213300	Uncharacterized protein	30,223	6704030
40S ribosomal protein S6	27,178	94086600	Histone H3-like centromeric protein CSE4	19,209	3973050
40S ribosomal protein S2	28,388	111921300	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	19,835	3900260
40S ribosomal protein S19	16,365	72167800	Uncharacterized protein	21,431	5571800
Triosephosphate isomerase	30,502	94257700	Uncharacterized protein	37,348	5884200
NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV	22,203	63352200	Actin	18,343	5244640
Actin	37,162	107280200	GTP-binding protein ypt1 (Fragment)	20,989	5237370
40S ribosomal protein S24	25,175	51772500	Uncharacterized protein	30,685	8406410
40S ribosomal protein S1	28,972	94676200	Prohibitin-1	30,935	6615000
40S ribosomal protein S14	16,054	48301900	EB1 C-terminal domain-containing protein	30,716	5368180
40S ribosomal protein S16	15,855	63978600	Proteasome endopeptidase complex	28,908	4990780
Ribosomal protein L11	16,47	48987400	DLH domain-containing protein	26,56	3820080
Malate dehydrogenase	36,002	83542100	Uncharacterized protein	13,374	3103430
40S ribosomal protein	29,627	81522000	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	20,928	4539660
Ribosomal protein L24	15,197	26749400	60S acidic ribosomal protein P0	33,714	4456840
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	27,483	49227300	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	35,072	6344950

RRM domain-containing protein	33,204	47857400	NMO domain-containing protein	38,854	5642470
Cytochrome b5 heme-binding domain-containing protein	14,745	13026000	6-phosphogluconolactonase	29,172	4856210
Uncharacterized protein	24,718	35127200	Peroxiredoxin	20,351	3051290
Uncharacterized protein	17,151	26309200	Adenine phosphoribosyltransferase	22,92	2892230
Proteasome subunit alpha type	29,264	49341400	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	17,638	1837040
Nuclear movement protein nudC	22,371	28164400	40S ribosomal protein S5	23,799	3669940
Uncharacterized protein	17,781	27903400	Calmodulin	13,605	1825140
J domain-containing protein	24,979	29125100	Tubulin beta chain	50,837	4652580
40S ribosomal protein S18	23,316	22892200	Uncharacterized protein	21,076	2979930
F-actin-capping protein subunit alpha	30,016	28814500	Fe-S biosyn domain-containing protein	26,682	3128360
ADF-H domain-containing protein	18,715	19044100	60S ribosomal protein L8-B	27,882	3205610
60S ribosomal protein L34-A	13,614	10347900	Cytochrome c oxidase subunit 2	29,382	1643540
40S ribosomal protein S4	29,317	34381400	HORMA domain-containing protein	29,609	2442110
Proteasome endopeptidase complex	29,736	18908900	RRM domain-containing protein	28,339	4024210
40S ribosomal protein	16,851	18478800	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36,427	4561010
40S ribosomal protein S15	17,599	14058300	Homoserine dehydrogenase	39,367	3953470
Uncharacterized protein	36,005	26924800	Calcineurin B	22,422	2265160
Cyanate hydratase	18,092	14055600	Protein hob3	25,181	3378810
Uncharacterized protein	14,069	8080800	Uncharacterized protein	33,792	2614440
NADH-ubiquinone oxidoreductase 30.4 kDa subunit, mitochondrial	32,799	24032100	CN hydrolase domain-containing protein	32,423	3336140
Maleylacetoacetate isomerase	26,671	13170000	HpcH_HpaI domain-containing protein	32,678	1963610
Uncharacterized protein	29,418	15117800	Uncharacterized protein	15,717	1410060
L51_S25_CI-B8 domain-containing protein	22,803	9947800	Septin-type G domain-containing protein	39,227	3659750
NADH-ubiquinone oxidoreductase	18,083	14618200	Prefoldin subunit 4	15,976	990960
Mitochondrial fission 1 protein	16,922	11606700	Glutathione peroxidase	22,439	1866980
Proteasome subunit alpha type	27,922	22030500	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	37,431	1996720
KRE9 domain-containing protein	27,181	10337700	ATP synthase subunit 4, mitochondrial	26,754	2443550
EF1_GNE domain-containing protein	25,053	5704100	Uncharacterized protein	30,614	1701490
Uncharacterized protein	19,051	9888000	Uncharacterized protein	28,203	1681770
60S ribosomal protein L2	27,501	13627300	Uncharacterized protein	37,057	2173130
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	32,126	18721100	60S ribosomal protein L30	11,574	736070
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	17,359	9232900	GTP-binding nuclear protein	23,898	1435090
Histone H2A	14,228	6743100	60S ribosomal protein L32	23,267	1408690
Chorismate mutase	30,899	16050140	Mitochondrial GTP/GDP carrier protein 1	33,215	2284110
Proteasome subunit beta	23,342	7418850	t-SNARE coiled-coil homology domain-containing protein	25,848	1558960
Protein YOP1	19,431	5403010	Uncharacterized protein	32,717	2004250
Histone H4	15,866	8940000	ATPase GET3	37,428	1821760
HIT domain-containing protein	15,014	8767780	TPR_REGION domain-containing protein	37,387	1380941
40S ribosomal protein S22	14,737	6830180	Uncharacterized protein	23,594	1395318
Deoxyuridine 5-triphosphate nucleotidohydrolase	22,251	8443000	Uncharacterized protein	30,772	1556422

Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	33,53	11774040	Uncharacterized protein	22,212	967839
Uncharacterized protein	35,038	14287420	Uncharacterized protein	38,588	1615828
F-actin-capping protein subunit beta	30,129	13437890	Glucose-6-phosphate 1-epimerase	34,67	1088319
PCI domain-containing protein	31,869	13950630	Uncharacterized protein	29,962	1086829
60S ribosomal protein L24	16,267	5717010	HMG box domain-containing protein	36,835	611110

ANEXO II

1. Proteínas enriquecidas na superfície celular de *Paracoccidioides* spp. inseridas como alvos de expressão em construções plasmidiais

A informação das sequências de aminoácidos das proteínas H2B (522 bases nitrogenadas) e Carreadora de ADP/ATP (1026 bases nitrogenadas), armazenadas no banco de informações Uniprot, foi transcrita reversamente para clonagem do gene em vetor otimizado para expressão em células humanas. Uma sequência Kozak (GCCACC) antes do códon iniciador ATG, e uma sequência líder de IgE (MDWTWILFLVAAATRVHS) antes da sequência tag com 6 histidinas, foram incorporadas a fim de melhorar a expressão e a imunogenicidade da vacina baseada em plasmídeo, respectivamente. Os genes alvo para construção de duas vacinas de DNA foram planejados para clonagem entre os sítios de restrição NheI e XhoI utilizando como esqueleto o vetor pcDNA3.1 (Figura 41A).

Os plasmídeos com as sequências inseridas no vetor esqueleto pcDNA 3.1+ foram projetados pelo nosso laboratório e então sintetizados comercialmente pela Genscript (Piscataway, Nova Jersey, Estados Unidos), conforme o esquema demonstrado na Figura 41B.

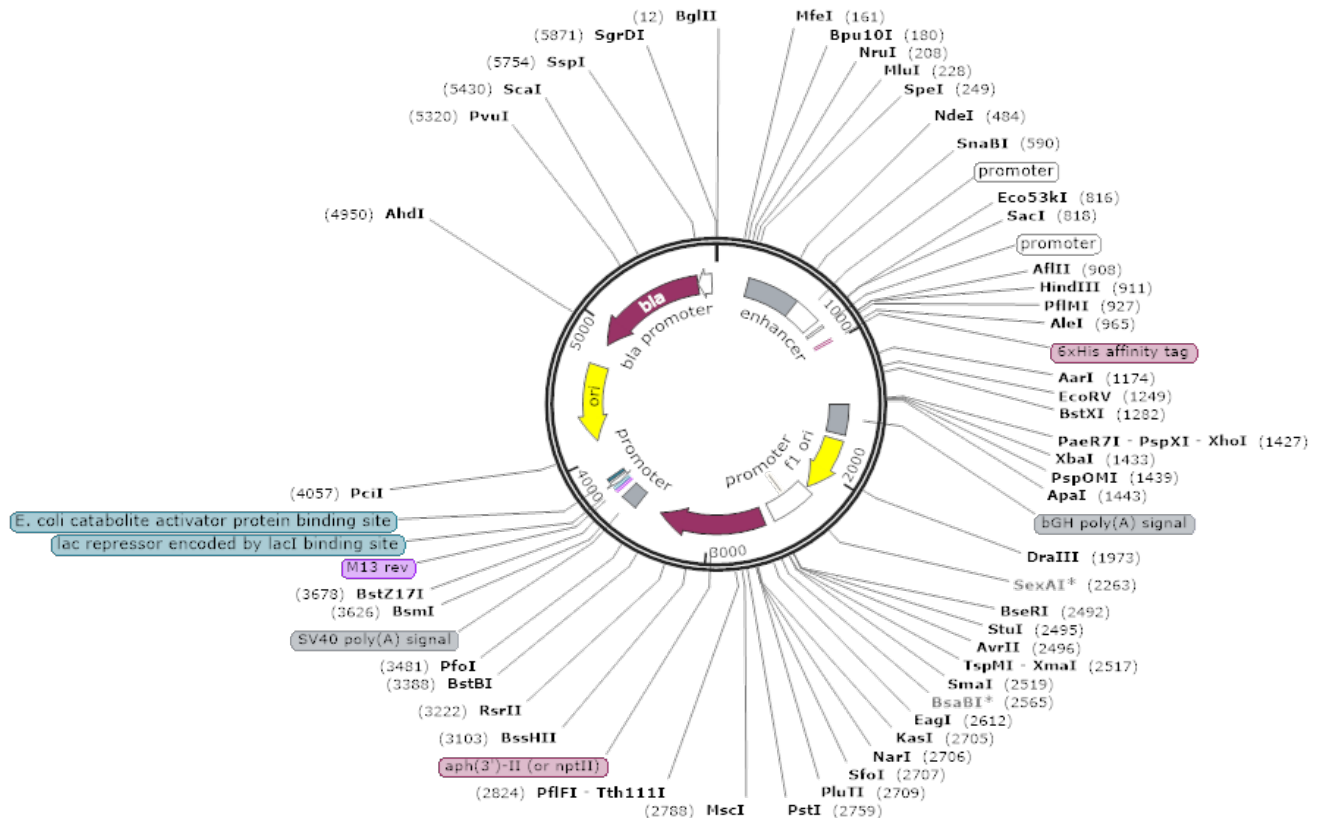
A**B**

Figura 41. Construção de vetor plasmidial com função de vacina de DNA.
(A) Estratégia na construção de cassete para inserção no vetor pcDNA 3.1+. Inseto entre HindIII e XhoI. O sítio NheI foi adicionado imediatamente antes do gene alvo a fim de permitir subclonagens em vetores pET de expressão heteróloga. **(B) Plasmídeo de DNA com cassete.** Vetor esqueleto para expressão em células de mamífero contendo o inseto.

2. A localização das sequências alvo foi confirmada no DNA plasmidial

As amostras liofilizadas das construções para vacina de DNA foram ressuspensas em água Milli-Q estéril para concentração final de 4µg/mL. As construções (50 ng) foram adicionadas a 25 µL de *Escherichia coli* DH5 alpha (estirpe para clonagem) termocompetente, e incubadas em gelo por 30 minutos. Após choque

térmico por 90 segundos, à 42°C, a amostra foi novamente incubada no gelo, por 10 minutos. Foram adicionados 800 µL de meio S.O.C. ao mix, o qual ficou sob agitação por 1 h/37°C, à 250 rpm. Volumes de 50µl, 100µl, e um concentrado (após centrifugação a 13.000xg por 2 minutos), das células transformadas, foram plaqueados em meio LB ágar (DIFCO/USA) com ampicilina (Sigma, St. Louis/MO). As placas foram incubadas à 37°C, overnight. Uma colônia de cada transformante foi inoculada em Caldo LB (DIFCO/USA) com ampicilina 100 µg/MI (Sigma, St. Louis/MO), a cultura ficou sob agitação overnight. Após coleta da cultura bacteriana por centrifugação a 6000 xg por 15 min a 4°C, seguiu-se com a propagação para obtenção de maior quantidade de DNA plasmidial, conforme protocolo do fabricante para maxi preparação (QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit).

O DNA plasmidial foi digerido para confirmar a a localização dos insertos, bem como o tamanho esperado das sequências de pares de bases (Figura 42). As reações para digestão enzimática dupla foram preparadas para um volume final de 10 µl. Cada amostra foi preparada com 600 ng de DNA, com 0,5 µL de cada uma das enzimas apropriadas aos sítios de clonagem (HindIII e XhoI), e 1 µl de tampão NEB2 10X (New England Biolabs/USA). A incubação foi feita a 37°C por 2h. As amostras foram preparadas em tampão de carregamento 6X concentrado (LGC Biotecnologia, São Paulo/Brasil), à base dos corantes Azul de bromofenol e Xileno cianol, para final 1X, e aplicadas em gel de agarose 1% em TAE 1X (LGC Biotecnologia, São Paulo/Brasil) acrescido do corante SYBR Safe (1:10000) (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific, São Paulo/Brasil). As bandas foram visualizadas sob luz UV.

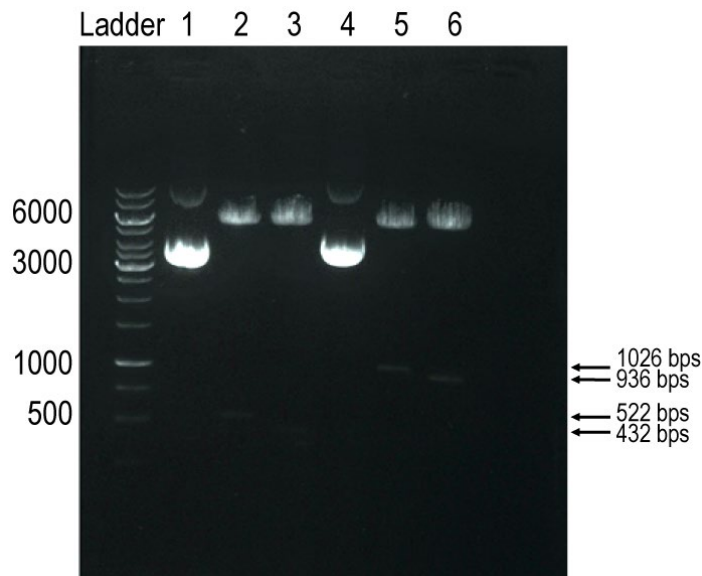


Figura 42. Linearização dos vetores para vacina de DNA e confirmação da clonagem dos insertos.

Ensaio de digestão dupla confirmaram o tamanho e a localização dos insertos (entre HindIII e XhoI), construídos com as sequências alvo para imunização como vacina de DNA e com as sequências utilizadas para otimizar a expressão. A posição dos alvos, isoladamente, também foi verificada (entre Nhe e XhoI) para planejamento de subclonagem em vetor pET. **1)** Vetor intacto (**pcDNA3.1+ :: h2b** – 5873 bps); **2)** Vetor linearizado com HindIII e XhoI (**pcDNA3.1+ - 5351 bps; h2b** – 522 bps); **3)** Vetor linearizado com Nhe e XhoI (**pcDNA3.1+ - 5441 bps; h2b** – 432 bps); **4)** Vetor intacto (**pcDNA3.1+ :: adp/atp** – 6377 bps); **5)** Vetor linearizado com HindIII e XhoI (**pcDNA3.1+ - 5351 bps; adp/atp** – 1026 bps); **6)** Vetor linearizado com Nhe e XhoI (**pcDNA3.1+ - 5441 bps; adp/atp** – 936 bps).

3. Eficiência da expressão proteica *in vitro* por células HEK e estímulo da produção de anticorpos pelas vacinas de DNA

Os vetores contendo sequências para expressão de Histona H2B e do Carreador de ADP/ATP seguidas por cauda de histidina foram transfectados em pequena escala em células de mamífero HEK293. As células, mantidas em frascos de 25 cm² contendo meio Eagle modificado por Dulbeco (DMEM) suplementado com penicilina-estreptomicina 1X e soro fetal bovino (SFB) a 10%, foram plaqueadas em uma concentração de 10⁶ células/poço, em placas de 24 poços. Após confluência de 70-80%, e uma hora antes da transfecção, o meio foi trocado para adaptação em DMEM com SFB 2%. Meio e suplementos Gibco (Thermo Fisher Scientific, São Paulo/Brasil). A transfecção foi feita por gotejamento de 1 µg de cada DNA

complexado à 3 µg de polietilenoimina (PEI) (Sigma-Aldrich, São Paulo/Brasil) em solução de NaCl 150 mM (J.T.Baker - Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA), após incubação por 10 minutos. Células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1 vazio foram utilizadas como controle negativo. A incubação foi feita à 37°C/CO₂ 5%.

As coletas dos sobrenadantes e células, após tratamento com tripsina, foram feitas 24, 48 e 72 horas após transfecção. As amostras foram preparadas em tampão 1X (Tris 1M pH 6,8, Glicerol, Azul de Bromofenol 1%, β-mercaptoetanol 10%, SDS 2%), e aplicadas em gel de poliacrilamida 12%. Após eletroforese, as frações proteicas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences do Brasil). As membranas foram bloqueadas overnight com BSA 3% em PBS1X, a 4°C, e em seguida incubadas em solução com anticorpo IgG anti-histidina (1:2500) ou com soro (1:1000) proveniente de camundongos imunizados com 50 µg dos plasmídeos via Intramuscular (IM) no músculo tibial anterior, seguidas por eletroporação *in vivo* (EP). Os experimentos *in vivo* para obtenção de soro policlonal foram feitos em duplicata e as doses administradas 2 vezes com intervalo de 14 dias. Os parâmetros para a eletroporação foram: dois pulsos de 130V com duração de 1ms e quatro pulsos de 70V com duração de 50ms aplicados com o CUY560-Eletrodo 5-0.5 usando o super eletroporador NEPA21 (NepaGene Co., Ltd.). O intervalo entre cada pulso foi de 450ms. A metodologia aplicada foi baseada no trabalho de Sales e colaboradores (SALES et al., 2017).

As membranas foram transferidas para solução com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:2500) (BioRad – Biotika Biotecnologia, São Paulo/Brasil). Os passos foram intercalados por lavagens com PBS1X Tween 0,05%, e incubações de 1 hora a 37°C. Para revelação foi preparada solução contendo peróxido e luminol numa proporção de 1:1 usando Kit ECL (Sinapse Biotecnologia - GE Healthcare, São Paulo/Brasil). A detecção da quimioluminescência foi feita em Fotodocumentador (Gel Doc XR + Gel Documentation System – BioRad). Os sobrenadantes de cultura de células transfectadas com os vetores de DNA para expressão da proteína carreadora de ADP/ATP foram reativos com anticorpo IgG anti-His (Figura 43) e não reativos contra soro murino (Dados não mostrados). Não houve reatividade contra o sobrenadante de cultura de células transfectadas com os vetores

de DNA para expressão de H2B, sugerindo ineficiência na expressão *in vitro* para essa proteína nos tempos de incubação observados (24, 48 e 72h).

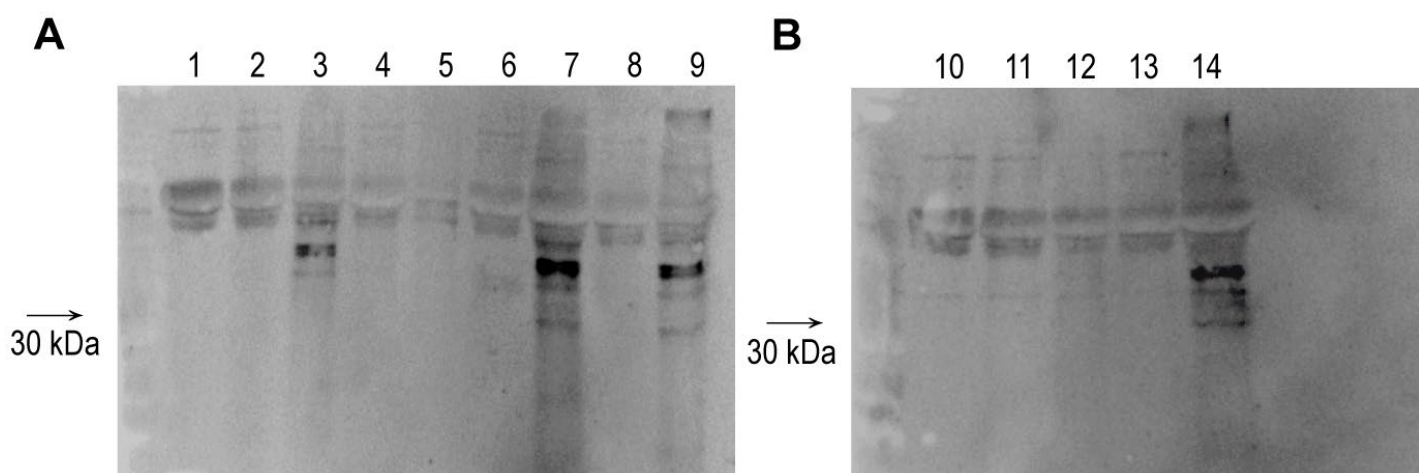


Figura 43. Confirmação de expressão dos antígenos H2B e Carreador de ADP/ATP por células HEK 293 transfetadas.

Amostras de sobrenadante de cultura coletadas após transfecção com vetores para expressão de H2B e da Proteína carreadora de ADP/ATP (sequências com cauda de histidina) foram testadas contra anticorpo IgG anti-His. A expressão *in vitro* foi confirmada apenas para Carreador de ADP/ATP. As bandas inespecíficas aparentes nas membranas são decorrentes de alto background (proteínas encontradas no meio de cultura). **1 e 10)** HEK 293T não transfetadas (Controle negativo); **2)** H2B 24h (lisado); **3)** H2B 24h (sobrenadante); **4)** H2B 48h (lisado); **5)** H2B 48h (sobrenadante); **6)** ADP/ATP 24h (lisado); **7)** ADP/ATP 24h (sobrenadante); **8)** ADP/ATP 48h (lisado); **9)** ADP/ATP 48h (sobrenadante); **11)** H2B 72h (sobrenadante); **12)** H2B 72h (lisado); **13)** ADP/ATP 72h (sobrenadante); **14)** ADP/ATP 72h (lisado).

A reatividade dos soros coletados (7, 14, 21 e 28 dias) pelo plexo orbital de animais imunizados com os vetores também foi testada por ELISA contra os extratos proteicos de leveduras de *Paracoccidioides*. As absorbâncias dos poços sensibilizados com as proteínas, e desafiados com os soros (diluições em série na razão de 3 a partir de 1:100), foram iguais aos dos poços controle (Dados não mostrados). A detecção foi feita com anticorpo secundário anti IgG conjugado a peroxidase (BioRad – Biotika Biotecnologia, São Paulo/Brasil). Revelação cromogênica foi feita com solução de tetrametilbenzidina (TMB) (BD OptEIA) e peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada em equipamento Epoch, à 450 nm, após adição de solução de parada H₂SO₄ 3M.

As análises com vacina de DNA sugerem a necessidade de otimização para a quantidade de imunizações ou para a concentração da solução antigênica de aplicação, a fim de gerar resposta imunológica satisfatória.

4. Subclonagem da sequência do carreador de ADP/ATP para o vetor pET28a

Os alvos escolhidos também podem ser utilizados para estimular a produção de anticorpos *in vivo* através da imunização com proteínas recombinantes. A sequência gênica para proteína carreadora de ADP/ATP, expressa com sucesso pelo método de transfecção, foi subclonada para vetor pET28a a partir do vetor pcDNA 3.1 e transformada em *E. coli* DH5-alpha (Figura 44). A proteína foi expressa por indução com IPTG em *E. coli* BL21DE3 e purificada por cromatografia de afinidade. As análises por SDS-PAGE mostraram que a proteína permaneceu no pellet bacteriano em corpo de inclusão (Dados não mostrados). Os clones foram estocados e serão utilizados para otimização dos métodos de purificação.

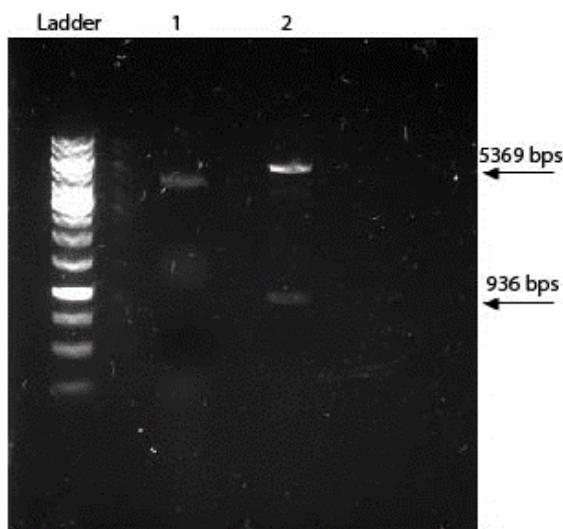


Figura 44. Linearização do vetor pET28a para confirmação da subclonagem da sequência para proteína carreadora de ADP/ATP.

Ensaio de digestão dupla confirmou o tamanho e a localização do inserto (entre Nhe e XhoI). **1)** Vetor intacto (pET28a :: *adp/atp*); **2)** Vetor linearizado com Nhe e XhoI (pET28a - 5369 bps; *adp/atp* - 936 bps).